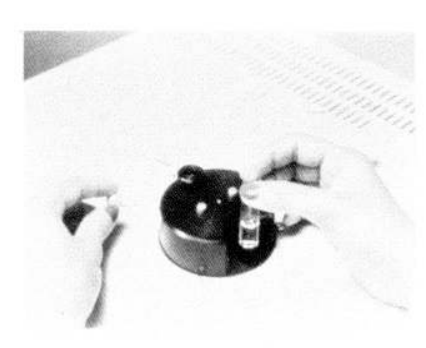
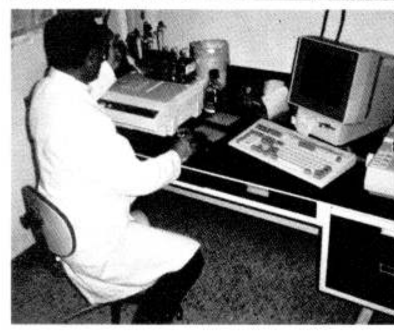
Série de la Protection de l'environnement





Méthode d'essai biologique essai de toxicité sur la bactérie luminescente



Rapport SPE 1/RM/24
Novembre 1992

Canada



Environnement Canada   Environment Canada

Méthode d’essai biologique: essai de toxicité sur la bactérie luminescente

Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada

Rapport SPE 1/RM/24
Novembre 1992

DONNÉES DE CATALOGAGE AVANT PUBLICATION (CANADA)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Essai de toxicité
sur la bactérie luminescente

(Méthode universelle; SPE 1/RM/24)
Publ. en anglais sous le titre: Biological test method.
Toxicity test using luminescent bacteria
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-98128-6
Nº. de cat. MAS En49-24/1-24F

1. Organismes aquatiques - - Effet des substances
toxiques sur -- Essais -- Méthodologie -- Normes --
Canada. 2. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes --
Canada. 3. Toxicité -- Tests -- Méthodologie --
Normes -- Canada. I. Canada.
Direction générale de la protection de l'environnement.
II. Canada. Environnement Canada.
III. Titre: Essai de toxicité sur la bactérie luminescente
IV. Coll.: Rapport
(Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/24.

QR82.V53B5614 1993 589.9'5 C93-099465-5

No. de cat. En49-24/1-24F
ISBN 0-662-98128-6

Commentaires

Pour formuler des commentaires sur la teneur du présent rapport, s'adresser à:

Richard Scroggins
Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Environnement Canada
335 River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria*. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Environmental Technology Advancement Directorate
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de toxicité sur la bactérie luminescente Vibrio fischeri.

Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser des essais sur un large éventail de substances. On y précise aussi d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou d'autres solides tels que des sols. Le lecteur y trouvera des instructions concernant la manipulation et le stockage des échantillons, les installations d'essai, la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Le résultat de l'essai est la concentration de l'échantillon qu'on estime qui cause une inhibition de 50 % de la production de lumière par la bactérie (c'est-à-dire la CI50). L'estimation de cette valeur peut se faire après 5, 15 ou 30 minutes d'exposition.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing toxicity tests with the luminescent bacterium Vibrio fischeri, *are described in this report.*

General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of substances. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific for assessing samples of chemical, effluent, leachate, elutriate, receiving water, and sediment or other solids such as soil. Included are instructions on sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and initiating tests, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

The endpoint of the test is the concentration of sample which is estimated to cause 50% inhibition of light production by the bacteria (i.e., the IC50). This could be estimated after exposures of 5, 15, or 30 minutes.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par la Direction de la protection de l'environnement (DPE) et sont recommandées pour les applications suivantes:*

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique d'Environnement Canada et des provinces;*
- *essais confiés à des entrepreneurs par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, par exemple celles prévues dans des règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites pouvant être requises dans un programme de réglementation ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils sont acceptables aux fins des programmes de protection et de conservation de l'environnement mis en oeuvre par Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou de solides assimilés.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et des formules chimiques

ATP	adénosine-triphosphate
°C	degré Celsius
CE50	concentration efficace 50
CIp	concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné
CL50	concentration létale 50
cm	centimètre
d	jour
g	gramme
g/kg	gramme par kilogramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
H_2O	eau
L	litre
MC	marque de commerce
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
N	normal
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
OD	oxygène dissous (concentration)
sp.	espèce
µg	microgramme
µL	microlitre
>	supérieur à
<	inférieur à
≥	supérieur ou égal à
≤	inférieur ou égal à
±	plus ou moins
%	pour cent
‰	parties par millier

Glossaire

Remarque: Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autre contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire.

L'auxiliaire *pourrait (pourraient)* est utilisé pour indiquer la possibilité que quelque chose existe ou se produise.

Termes techniques généraux

Bioluminescence - Phénomène d'émission de lumière chez un organisme vivant par suite de ses activités biochimiques, généralement enzymatiques.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend de la concentration, de la valence et de la mobilité des ions en solution, ainsi que de la température de la solution. La conductivité des eaux douces s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en micromhos par centimètre (1 mS/m = 10 µmhos/cm). La conductivité est une méthode courante de mesure de la salinité (*cf.* ce terme), le résultat étant normalement exprimé en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté permet de mesurer la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Floculation - Formation d'un agglomération de particules légères en suspension (floc) dans une solution.

Luminescent - Qui émet de la lumière pour une raison autre qu'une température élevée.

Lyophilisé - Qui a été soumis à une déshydratation à basse température et sous vide; les bactéries utilisées pour l'essai sont reçues du fournisseur dans cet état.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes; les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie de substance (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en volume par unité de volume (*V/V*) ou en masse par unité de masse (*m/m*). On les exprime en pourcentage de la substance finale.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou dilution avant l'essai visant à établir sa toxicité.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'une solution aqueuse. Dans le cas de l'eau de mer, elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Dans le présent document, elle est exprimée en pourcentage, conformément à ce qui se fait dans les manuels Microtox. Elle s'exprime habituellement en parties par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰), qui en représentent un équivalent approximatif.

Surfactant - Substance tensio-active (p. ex., un détergent) qui, ajoutée à un liquide non aqueux, en réduit la tension superficielle et facilite la dispersion des matières dans ce liquide.

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimensuelle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique à la vérification et à la mesure périodiques de certaines variables biologiques ou relatives à la qualité de l'eau, soit au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, ou de milieux récepteurs pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances d'essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne pas renfermer la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité en raison de conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de contrôle/de dilution, santé des organismes soumis à l'essai ou effets attribuables à leur manipulation).

Diluant - Eau normalisée servant à diluer la substance à expérimenter dans l'essai Microtox; *cf.* «eau de dilution».

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'un cours d'eau, d'un lac, d'un estuaire ou d'une masse d'eau marine) qui n'est pas soumise à l'influence d'un effluent (ou d'autre substance à expérimenter), du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations en vue d'un essai de toxicité. L'eau de dilution dans l'essai Microtox est une formulation particulière d'eau salée appelée «diluant» (*cf.* ci-dessus).

Eau de porosité - Eau, à l'intérieur d'un sédiment (ou d'une substance assimilée), qui entoure les particules solides ou qui est entraînée par elles. La quantité d'eau de porosité s'exprime en pourcentage de la masse du sédiment humide.

Eau désionisée - Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée - Eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

Eau estuarienne - Eau saumâtre des parties côtières des océans résultant de la dilution mesurable de l'eau de mer par l'eau douce apportée par les cours d'eau.

Eau marine **-** Eau de mer qui se trouve ou qui est prélevée dans l'océan, dans la mer ou près des côtes, à un endroit où elle n'a pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle apportée par les cours d'eau.

Eau usées - Terme générale englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent - Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., sédiments, stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sols ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de surface naturelle (p. ex., d'un cours d'eau) où des déchets ont été ou sont sur le point d'être déversés (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser lequel de ces deux sens s'applique dans le contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire pour ce produit.

Sédiment - Substance naturelle formée de particules qui ont été transportées au fond d'une masse d'eau et qui s'y sont déposées. [Dans certaines sections du présent rapport, ce terme est employé, à des fins de commodité, pour désigner aussi des substances assimilées telles que des sols et des boues résiduelles d'installations industrielles et municipales.]

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations requises.

Substance - Type particulier de matière ayant des propriétés relativement uniformes.

Témoin - Dans le présent rapport, s'emploie de la même façon que le terme «contrôle» (*cf.* ci-dessus).

Termes de toxicologie

Aigu - Qui a lieu dans un bref intervalle par rapport à la durée de vie de l'organisme; il s'agirait d'un intervalle de l'ordre de quelques minutes pour des bactéries, et généralement de quatre jours ou moins pour des poissons.

CE50 - Concentration efficace 50 (ou Médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime qui cause un effet particulier chez 50 % des sujets qui y sont exposés. L'effet pourrait être létal mais est généralement sublétal. La CE50, comme la Cl50, s'applique à un effet de type «tout ou rien», car chaque sujet exposé doit être classé comme ayant cet effet ou ne l'ayant pas. L'effet doit être précisé, et souvent aussi la durée d'exposition, par exemple «CE50 pour l'échec de la reproduction après deux mois» ou «CE50 pour les réactions d'évitement». Ce terme ne s'applique pas à une réduction d'un certain pourcentage d'une fonction donnée chez un organisme ou un groupe d'organismes; en conséquence, on ne devrait pas l'utiliser au sujet de l'essai Microtox (cf. «CIp»).

CIp - Concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné. Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration à laquelle la substance à expérimenter provoque une réduction donnée d'une fonction biologique mesurable, comme la production de lumière par des bactéries ou la croissance de poissons, par rapport à ce qu'on observe chez de témoins. Cette expression devrait être appliquée à tout essai toxicologique qui sert à mesurer la variation d'un phénomène mesurable, comme le taux de reproduction, la vitesse de croissance ou la fréquence respiratoire. (L'expression CE50, ou concentration efficace 50, ne s'applique pas à des essais de cette nature parce qu'elle est limitée à des résultats de type «tout ou rien», comme le fait d'estimer que 50 % des organismes exposés à cette concentration subiraient un effet particulier, tandis que les autre 50 % ne manifesteraient aucun effet.)

CL50 - Concentration létale 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime létale pour 50 % des organismes qui y sont exposés. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par analyse statistique de la mortalité à plusieurs concentrations d'essai, après une durée d'exposition donnée. Cette durée doit être précisée (p. ex., CL50 après sept jours). Ce résultat ne peut pas être employé avec l'essai Microtox.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer soit le nombre d'organismes touchés par l'exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'eaux usées, de milieux récepteurs ou de liquides provenant de sédiments ou de substances solides assimilées (effet de type «tout ou rien»), soit l'intensité des effets observés (effet mesurable). L'essai sur les bactéries luminescentes doit être considéré comme un essai de toxicité à résultat mesurable, car il ne sert pas à établir la proportion des bactéries qui sont directement touchées, mai plutôt le degré de réduction d'une fonction physiologique chez des groupes de bactéries.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du pH, filtration, aération), suivi d'essai de toxicité. Cette évaluation permet de définir les agents qui sont les principaux responsables de la toxicité dans un mélange complexe. L'essai de toxicité peut être létal ou sublétal.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. On entend généralement par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (concentration létale, CL50, etc.).

Sublétal - Nocif pour un organisme vivant, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants. Les effets pourraient être létaux ou sublétaux.

Remerciements

*Le présent document a été rédigé en collaboration par J.B. Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario) et D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.). Il est basé en grande partie sur les méthodes existantes de la société Microbics (*cf. *section 1). M. G.A. Sergy et M. R.P. Scroggins [Protection de l'environnement (PE), Conservation et Protection (C. et P.), Environnement Canada] ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.*

*Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique qui s'est chargé de la première et de la dernière révision [G. Joubert (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy, Québec), M. Korchinski (Alberta Energy Resources Conservation Board, Calgary, Alb.) et A.A. Qureshi (Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alb.)] et celui de C. Blaise, B.J. Dutka, G. Elliott et G.C. van Aggelen, membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (*cf. *annexe B). M. P.C. Thomas, de l'ancienne société Microbics Enterprises (Forest, Ont.) a généreusement fourni la documentation technique et prêté l'équipement pour les essais.*

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue des versions préliminaires ou la version définitive du présent rapport, ont offert des informations et des nombreux conseils utiles : C. Bastien (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy, QC); Y. Bois (Technitrol · Eco, Pointe-Claire, Qc); A.A. Bulich et M.W. Greene (Microbics Corp., Calrsbad, CA); J.E. Cairns (Dearborn Chemical Co., Ltd., Mississauga, Ont.); N.A. Casseri (OxyChem, Grand Island, NY); J. Coyle (U.S. Fish & Wildlife Service, Columbia, MO); K.G. Doe, M. Nicol et J.D.A. Vaughan (C. et P., Dartmouth, N.-É.); E. Dombroski (Alberta Enviornmental Centra, Vegreville, Alb.); J.I. Fujikawa (Alberta Environment, Lethbridge, Alb.); M.S. Henebry (Illinois Environmental Protection Agency, Springfield, IL); K. Ho (University of Rhode Island, Narragansett, RI); R.A. Hoke (AScI Corp., Duluth, MN); K.L.E. Kaiser et S. Skog (C. et P. Burlington, Ont.); L. Kennedy (Massachusetts Environmental Quality Engineering, Westborough, MA); G. Kurz (Dept. of PUblis Works, Chattanooga, TN); E. Lee (B.C. Research, Vancouver, C.-B.); E.A. Power (E.V.S. Consultants, North Vancouver, C.-B.); Y. Roy (Analex Inc.); B. Salahub (Chemical & Geological Laboratories Ltd., Edmonton, Alb.); J. St-Onge (Stone-Consolidated Inc., Grand-Mère, QC); et S. Yee (C. et P., North Vancouver, C.-B.).

Les photographies de la page couverture ont été fournies par M. Christian Blaise, D. Sc., Direction de l'écologie et des écosystèmes, Centra Saint-Laurent, Environnement Canada.

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais de toxicité aquatique pour mesurer, prévoir et contrôler le rejet de substances qui pourraient être nocives pour les organismes aquatiques. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (*cf.* annexe A), a proposé l'élaboration et la normalisation d'une série d'essais de toxicité aquatique qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez des organismes représentatifs de différent niveaux trophiques et groupes taxonomiques (Sergy, 1987). Un essai de toxicité sur des bactéries luminescentes était l'un des essais de toxicité aquatique qu'on a choisi pour aider à respecter les exigences d'Environnement Canada en matières d'essais[1].

Le présent rapport décrit les méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai sur des bactéries luminescentes. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on applique cet essai à l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou d'autres substances solides) (*cf.* figure 1). Les méthodes et conditions particulières applicables à la conduite de l'essai et à sa normalisation sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

Bien que l'on puisse dire de façon générale que cet essai vise à mesurer la luminescence d'une souche bactérienne, les méthodes exposées ci-après ne s'appliquent qu'au seul système d'essai qui était disponible dans le commerce au Canada au moment de la rédaction du présent rapport[2], soit l'essai Microtox^MC. La méthode d'essai décrite ci-après est la propriété exclusive de la société Strategic Diagnostics Inc. (antérieurement Microbics et AZUR Environmental Corp.) de Carlsbad (Californie).

SDI fournit des instructions détaillées pour l'exécution de l'essai; le présent rapport ne les remplace pas, mais il les résume plutôt afin d'en faciliter l'apprentissage, de fournir des conseils utiles et de les compléter. Les méthodes d'essai que l'on peut obtenir chez *SDI* et auprès d'organismes gouvernementaux ou internationaux n'abordent pas nécessairement toutes les questions telles que la manipulation de différents types d'échantillons, l'ajustement du pH, la modification des méthodes en fonction des objectifs des essais ou des types d'échantillons, ou encore le traitement des échantillons qui contiennent des quantités importants de matières solides ou flottantes.

Les documents méthodologiques existants décrivent généralement des méthodes applicables à l'analyse d'échantillons d'effluents ou de produits chimiques, mais ils ne fournissent parfois qu'un minimum de renseignements sur l'analyse d'échantillons de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou de solides assimilés.

---

[1] Suivant la recommendation du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique, on a déjà publié cinq méthodes relatives à des essais portant sur des poissons et des crustacés (Environnement Canada, 1990a, 1990b, 1990c, 1992a et 1992b).

[2] Une méthode et des produits semblables et compétitifs (LUMIStox^MC) sont maintenant commercialisés en Europe.

Méthodes universelles

- Stockage des bactéries et des réactifs
- Reconstitution du réactif bactérien
- Préparation des solutions d'essai
- Ajustement du pH, au besoin
- Produits toxiques de référence
- Mise en route de l'essai
- Observations pendant l'essai
- Résultats
- Correction photométrique (couleur et turbidité)
- Calculs
- Considérations juridiques

Questions traitées dans chacune des quatre catégories ci-dessous

- Étiquetage et stockage des échantillons
- Préparation des solutions d'essai

Produits chimiques

- Propriétés chimiques
- Mesures chimiques

Effluents, lixiviats et élutriats

Milieux récepteurs

- Contenants pour les échantillons
- Transport des échantillons
- Mesures sur les échantillons
- Sites marins et estuariens

Sédiments et solides assimilés

- Transport des échantillons
- Mesures sur les échantillons
- Essais sur les liquides dérivés
- Choix de l'eau de dilution
- Essais «en phase solide»
- Installations
- Méthodes spéciales

Figure 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances

En décrivant les méthodes figurant dans le présent document, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les résultats soient assez exacts et précis pour la majorité de leurs cas d'application. Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le lecteur ne trouvera pas ici d'instructions explicites sur chaque détail, car il peut les obtenir dans les guides Microtox.

1.2 *L'essai et l'espèce bactérienne utilisée*

L'essai Microtox utilise une souche particulière de la bactérie marine *Vibrio fischeri*[3] pour la détermination de la toxicité d'échantillons. Cette bactérie émet de la lumière au cours de son processus métabolique normal, et l'on mesure sa luminescence au moyen d'un photodétecteur normalisé, dans des conditions définies. La diminuation de la luminescence après 5, 15 ou 30 min d'exposition sert de mesure de la toxicité.

L'essai de toxicité Microtox a été préparé commercialement et mis en vente pour la première fois en 1978. À l'heure actuelle, il se vend et est utilisé dans le monde entier, et il existe une vaste documentation scientifique portant sur cet essai et ses résultats (Bulich, 1986; Microbics, 1989a). Les chercheurs canadiens Kaiser et Ribo (1988) ont rassemblé une banque de données toxicologiques de grande envergure sur l'essai Microtox. L'essai de bioluminescence bactérienne ne se limite pas aux polluants en milieu aquatique; par exemple, l'USP (*United States Pharmacopeia*) envisage de s'en servir pour analyser des substances utilisées dans la fabrication de contenants pour des médicaments et des instruments médicaux (USP, 1989).

L'existence de données de toxicité obtenues antérieurement grâce à cet essai, sa sensibilité éprouvée aux polluants en milieu aquatique et sa très grande accessibilité, puisque c'est une technique normalisée, en font un choix logique comme outil d'analyse pour les laboratoires canadiens[4]. L'essai Microtox a fait l'objet d'études comparatives avec 50 autres essais à petite échelle (Munkittrick et Power, 1989); il a été reconnu comme étant «très utile pour l'analyse préliminaire d'échantillons sur le terrain», et il a obtenu une cote élevée de «validité sur le plan environnemental» (c.-à-d., de concordance avec les effets globaux observés chez des poissons et des crustacés). Au moins une province a adopté une méthode Microtox normalisée (BNQ, 1987), et d'autres provinces disposent de documents non officiels décrivant la méthode dans ses grandes lignes (*cf.* 1.2.1). En Colombie-Britannique, on choisi l'essai Microtox pour surveiller, trois fois par semaine, les effluents de certaines usines de pâtes à papier.

L'essai est particulièrement utile pour le dépistage ou la surveillance en raison de sa rapidité, de sa simplicité, du faible volume des échantillons et de son coût minime, une fois que l'on dispose du photomètre ou analyseur (*Analyzer*[5]). Il convient à l'évaluation de la toxicité à court terme d'effluents urbain ou industriels, de lixiviats, d'élutriats, d'eaux de surface dans des zones de mélange, de produits

---

[3] Il existe de nombreuses souches de cette bactérie, et l'on sait que certaines d'entre elles diffèrent des autres quant à leur sensibilité aux substances toxiques. Pour l'essai Microtox, *SDI** a choisi la souche NRRL B-11177, déposée au *Northern Regional Research Laboratory* à Peoria, Illinois (É.-U.).

[4] L'utilisation de cet essai ne constitue nullement une recommendation de la part d'Environnement Canada ou de l'un ou l'autre de ses laboratoires.

[5] Dans le présent rapport, on a adapté en français la terminologie utilisée par *SDI* pour les réactifs, l'appareillage et la marche à suivre. Toutefois, pour permettre à l'utilisateur de travailler plus facilement avec les guides de *SDI*, qui ne sont disponibles qu'en anglais, chaque terme est suivi, à sa première occurrence ou plus fréquemment au besoin, de son équivalent anglais (en italique et entre parentèses).

chimiques, de substances toxiques libérées par des sédiments ou des sols et, en fait, de toutes les substances qui pénètrent dans l'eau à partir de sources diverses. Avec l'essai Microtox, on peut également analyser directement des échantillons de sédiments ou d'autre substances semi-solides comme les boues résiduelles d'installations municipales ou industrielles; l'essai a aussi été recommandé pour l'analyse des sols de sites de déchets contaminés (EPA, 1987, 1989c). On pourrait l'employer pour évaluer les progrès de la détoxication ou de la biodégradation de substances toxiques.

L'essai est pratique parce qu'il n'est pas nécessaire de conserver une culture de bactéries vivantes; on achète des bactéries lyophilisées que l'on peut entreposer pendant plusieurs mois, tout comme un réactif chimique. Cette caractéristique rend l'essai Microtox pratique pour des comparaisons chronologiques de la toxicité mesurée sur le terrain à une usine ou un endroit donné. La rapidité de l'analyse et la possibilité de faire de nombreux essais sans beaucoup de frais supplémentaires facilitent la mise en oeuvre de vastes programmes de dépistage de la toxicité d'effluents ou de produits chimiques, de détermination des constituants toxiques d'un rejet complexe, ou d'autres recherches de grande envergure. Par exemple, l'essai a été utilisé lors de relevés sur de grandes sections du fleuve Saint-Laurent (Kaiser *et al.*, 1988a).

En général, la sensibilité de cet essai équivaut à celle d'essais de létalité aiguë portant sur des poissons (Munkittrick et Power, 1989; Munkittrick *et al.*, 1991). Comparativement aux essais de létalité portant sur la tête-de-boule, la truite et la daphnie, l'essai Microtox est à peu près aussi sensible aux composés organiques purs, aux eaux usées urbaines et aux effluents industriels les plus toxiques, mais il est souvent moins sensible aux produits toxiques inorganiques et aux pesticides (Munkittrick et Power, 1989; Munkittrick *et al.*, 1991).

Par rapport à un essai sur une espèce particulière de poisson ou d'autre organisme pluricellulaire, l'essai Microtox peut présenter une variation importante de la sensibilité à une substance toxique donnée; dans certaines cas, on obtient des différences de quelque cent fois, en plus ou en moins (Munkittrick *et al.*, 1991). Cela ne constitue pas nécessairement un désavantage, car les microorganismes sont parfois au nombre des espèces les plus sensibles dans les écosystèmes aquatiques, et l'on recommande de toujours en utiliser pour les évaluations de la toxicité (Sloof *et al.*, 1983). Cette recommandation est conforme à l'excellent principe qui prévoit l'utilisation d'une série d'essais de toxicité. Pour certaines substances toxiques, l'organisme le plus sensible peut être un invertébré ou un microorganisme, tandis que pour d'autres, ce sera un poisson ou une plante. Pour protéger un écosystème aquatique, on devrait donc disposer de renseignements sur la toxicité chez divers organismes. Il s'ensuit naturellement que l'on ne devrait pas s'attendre à ce qu'un type d'organisme permette de prévoir la sensibilité d'un autre type d'organisme. Il ne faudrait pas supposer qu'un essai Microtox permettra de prévoir les résultats d'un essai avec la truite, ou qu'un essai avec la truite permettra de prévoir les résultats d'un essai Microtox. Il faudrait plutôt considérer que l'absence d'un corrélation de ce genre prouve encore davantage qu'il est souhaitable d'effectuer des essais sur divers organismes.

Vibrio fischeri est un organisme marin, et l'essai Microtox se fait normalement à une salinité de 2 ‰, obtenue par l'addition à l'échantillon d'une solution d'ajustement de la salinité (ou de NaCl) et par l'utilisation d'une eau de dilution ou diluant (*Diluent*) dont la salinité est de 2 %. La bioluminescence de la bactérie est aussi élevée à une salinité de 2 % que dans de l'eau de mer non diluée, dont la salinité est d'environ 3,5 %; toutefois, elle varie légèrement à l'intérieur de cet intervalle, l'intensité maximale étant observée à 2,7 % (Krebs, 1983). Par conséquent, on peut analyser des échantilllons d'eau de mer non

diluée si on le désire, mais il est important d'effectuer le test à une salinité d'au moins 2 %.

Il se pourrait que la toxicité d'une substance donnée en eau douce soit différente de celle mesurée en eau salée et que les résultats de l'essai Microtox conviennent peut-être moins bien à la protection des eaux douces. Cependant, la plupart des substances toxiques communes ont la même toxicité chez les organismes d'eau douce que chez les organismes marins, lorsque chaque organisme est étudié dans son propre milieu (Sprague, 1985). L'expérience prouve que l'essai Microtox donne généralement des résultats de toxicité semblables à ceux des essais de létalité aiguë portant sur des organismes d'eau douce (Blaise et al., 1987; Munkittrick *et al.*, 1991); il compte donc parmi les outils d'étude de la toxicité en eau douce. L'addition de sucrose, au lieu de sels pour ajuster la pression osmotique des solutions pourrait s'avérer un choix pertinent pour les analyses de toxicité en eau douce (*cf.* 4.8.4).

Au Canada, on peut se procurer chez *Strategic Diagnostics Inc.*[6] les guides techniques, la souche bactérienne spécifique, les fournitures et le matériel requis pour l'essai Microtox. Les premiers guides préparés par Microbics sont inclus dans la liste des références (Microbics, 1988a, 1988b et 1989b); la société a publié récemment un guide mis à jour et complet (Microbics, 1992). Un manuel d'instructions plus ancien (Beckman, 1982) fournit des détails utiles concernant certains aspects des essais. Divers documents sur les applications de l'essai («*Microtox Application Notes*») sont énumérés dans la section des références (*cf.* Microbics, 1983), et certaines applications particulières sont traitées dans les guides généraux (Microbics, 1989b); elles concernent des sujets précis, dont une méthode rapide de dépistage, les effluents complexes et les eaux souterraines. On peut se procurer, chez *SDI*, une vidéocassette de formation qui constitue un guide utile pour l'exécution de l'essai. Une bibliographie énumère les travaux de chercheurs qui ont utilisé et évalué l'essai Microtox (Microbics, 1989a).

Le Québec possède une méthode Microtox officielle (BNQ, 1987). Des guides techniques ont été produits par deux organismes du gouvernement de l'Alberta, soit l'*Energy Resource Conservation Board* (Alberta, 1986) et le ministère de l'Environnement (Alberta (1987). En Alberta, l'essai Microtox est utilisé couramment pour analyser des extraits d'hydrocarbures, des liquides de forage, des sols et des sédiments, ainsi que des produits chimiques et des eaux. Un comité officieux d'utilisateurs de l'essai Microtox dans l'Ouest canadien (*Western Canada Microtox Users Committee*) a effectué des essais comparatifs inter laboratoires et a facilité la normalisation. Le ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique possède un document d'orientation interne relatif à cet essai. Environnement Canada a également préparé un guide méthodologie sur le sujet (Dutka, 1988). Une brève description d'un mode opératoire normalisé a été préparée par un centre d'essais de l'*Environmental Protection Agency* de États-Unis (EPA, 1989). En Allemagne, la version préliminaire d'une méthode normalisée (DIN, 1989) fournit des instructions générales concernant l'utilisation d'un photomètre et la préparation de solutions. Les instructions contenues dans le document allemand correspondent à la méthode Microtox, sans mentionner le nom de cette méthode ni la société Strategic Diagnostics Inc.; toutefois, on y précise que les bactéries lyophilisées sont vendues commercialement. Tous ces documents ont été utilisés au cours de la préparation du présent rapport et, en général, ils décrivent tous la même méthode.

---

[6] Les numéros de téléphone et de télécopieur pour communiquer avec *SDI* sans frais à partir du Canada sont respectivement 1-800-544-8881 et 1-302-456-6782. L'adresse de la société est : Strategic Diagnostics Inc. Corporation, 2232 Rutherford Road, Carlsbad, California 92008-8883, U.S.A. La mention de produits commerciaux et de leurs fournisseurs ne constitue nullement une recommendation de la part d'Environnement Canada ou de l'un ou l'autre de ses laboratoires; ces renseignements sont fournis pour la commodité du lecteur.

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce

Les organismes soumis à cet essai proviennent d'une culture normalisée et appartiennent à une souche particulière de *Vibrio fischeri*, appelée «NRRL B-11177». Cette bactérie vit normalement dans les océans et produit continuellement, en présence d'une quantité suffisante d'oxygène, une lumière bleu-vert résultant de réactions enzymatiques.

2.2 Source et conservation

On peut se procurer la culture bactérienne normalisée chez *SDI*. D'après *SDI*, les bactéries proviennent d'une souche génétiquement homogène; elles sont récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance puis lyophilisées (c.-à-d. déshydratées à basse température et sous vide). On achète les bactéries sous cette forme, en petits lots dans des contenants scellés dont chacun peut servir à des essais pendant au moins 2 h après la reconstitution des bactéries au stade actif[7].

Lorsque le contenant de réactif bactérien (*Bacterial Reagent*) lyophilisé est conservé dans un congélateur à -20° C, son contenu demeure stable pendant un an (Microbics, 1989b). La durée de stockage peut être constante; il ne faudrait donc pas utiliser de réfrigérateurs ou de congélateurs à dégivrage automatique ou «sans givre».

On ramène les bactéries au stade actif ou vivant de réactif reconstitué (*Reconstituted Reagent*) en y ajoutant une solution de reconstitution (*Reconstitution Solution*) et en haussant leur température jusqu'à 5° C.

[7] Pour plus de renseignements sur la durée de travail utile des bactéries reconstituées, *cf.* 4.3.1.

Système d'essai

3.1 Principes de l'essai et variabilité

Des sous-échantillons de réactif bactérien reconstitué sont mis en présence de diverses concentrations de l'échantillon, à raison d'environ un million de bactéries dans chaque cuvette. On postule que toute action toxique des substances présentes dans l'échantillon influe sur les processus métaboliques des bactéries et que l'inhibition de la bioluminescence est proportionnelle à l'effet sur le métabolisme. Cette inhibition est mesurée et exprimée sous forme de CI50 (soit la concentration qui provoque 50 % d'inhibition[8]) après des durées d'exposition déterminées (5, 15 ou 30 min, ou toutes ces durées).

3.1.1 Limites et reproductibilité

On effectue à la main toutes les manipulations de l'échantillon et des bactéries. La reconstitution des bactéries, le maniement du micropipetteur, le mélange des solutions, etc, dépendent donc de l'habileté de l'analyste. La variabilité des volumes transférés par un bon analyste pourrait être à l'origine d'une incertitude d'environ 1 % des mesures photométriques. Un autre pour cent de variation pourrait être attribuable aux variations géométriques dans la fabrication des cuvettes (Beckman, 1982).

Le ministère de l'Environnement du Québec (BNQ, 1987) a effectué des essais et a établi, à partir de 236 résultats, que les valeurs minimale et maximale qui peuvent être mesurées tout en étant significatives sur le plan statistique sont respectivement de 17 et de 83 % d'inhibition de la bioluminescence. Dans le même ouvrage, on fixe la limite de détection à 12 % d'inhibition.

La variabilité de l'essai Microtox est faible en comparaison de celle des autres essais de toxicité en milieu aquatique. Dans une série de 81 essais effectués avec un produit toxique de référence (le laurylsulfate de sodium), le coefficient de variation global a été de 18 % (Bulich *et al.*, 1981)[9]. Pour chacun des trois lots de bactéries employés lors de ces essais, les coefficients de variation individuels se situaient entre 6 et 10 %. Bien que les essais aient été exécutés par trois personnes avec trois photomètre différents, on n'a pas observé de différences importantes dans les résultats. Dans une autre étude, pour une série d'essais répétés, l'écart moyen absolu des CI50 pour huit produits chimiques organiques a été de 10 % (Curtis *et al.*, 1982). Trois laboratoires ont effectué, pour l'Association pétrolière du Canada, des essais qui ont donné un coefficient de variation moyen de 11 % (Strosher, 1984). Munkittrick et Power (1989) résument ces comparaisons et d'autres en établissant une liste de coefficients de variation moyens qui vont de 2 à 30 %, sauf dans le cas des essais avec des métaux, où le coefficient moyen est de 60 %.

3.1.2 Interférence et autres limitations

La couleur vive d'un échantillon, particulièrement le rouge ou brun, peut faire obstacle à la transmission de la lumière et, ainsi, aux mesures de la toxicité. Ce facteur pourrait

---

[8] Dans tous les documents provenant de *SDI*, dans la documentation scientifique américaine en général et, souvent, dans des ouvrages canadiens, la CI50 est appelée à tort CE50 (*cf.* Glossaire). À l'avenir, il est certain que cette erreur sera corrigée, puisque l'ASTM (*American Society for Testing and Materials*) reconnaît l'exactitude du terme CI et en préconise l'utilisation pour les essais appropriés.

[9] C. Bastien, du ministère de l'Environnement du Québec, a obtenu des coefficients de variation similaires (de 15 à 20 %) au cours d'essais effectués avec ce même produit toxique de référence sur une période de quatre ans.

être important dans le cas de certains effluents, par exemple ceux des usines de pâte et papier. On peut alors effectuer un calcul de correction photométrique après un essai complémentaire exécuté avec la cuvette de correction photométrique (*Colour Correction Cuvette*), comme le prévoit la sous-section 4.9.

La turbidité résultant de la présence de matières en suspension peut également réduire la transmission de la lumière et augmenter les mesures de la toxicité. La méthode de correction photométrique mentionnée ci-dessus peut être utilisée dans le cas de particules sombres qui absorbent la lumière, mais elle est inefficace dans le cas de particules blanches qui la reflètent. La concentration la plus forte d'échantillon qu'on analyse avec la technique Microtox normale est de 45 % (*cf.* 4.2.2). Si l'échantillon est peu toxique, un analyste pourrait vouloir effectuer l'essai avec un échantillon non dilué ou presque. On peut le faire à l'aide de la technique spéciale décrite à la division 4.8.3.

Les durées d'exposition sont quelque peu arbitraires, comme dans tous les essais de toxicité, et l'on doit juger des temps appropriés. La plupart des essais Microtox se font en 15 min. L'action du phénol est complète après 5 min; la meilleure mesure de sa toxicité est donc la CI50 après 5 min d'exposition. Dans le cas des métaux bivalents, la bioluminescence peut continuer à décroître après 15 min d'exposition ou plus. Pour les échantillons dont on ne connaît pas les constituants toxiques, il faudrait donc prendre des mesures après plusieurs durées d'exposition normales, puis retenir celle qui convient le mieux. La meilleure durée d'exposition serait celle qui se termine lorsque l'inhibition de la bioluminescence se stabilise, ou immédiatement après, c'est-à-dire celle qui ne laisse à la substance toxique que le temps nécessaire pour exercer son action au maximum.

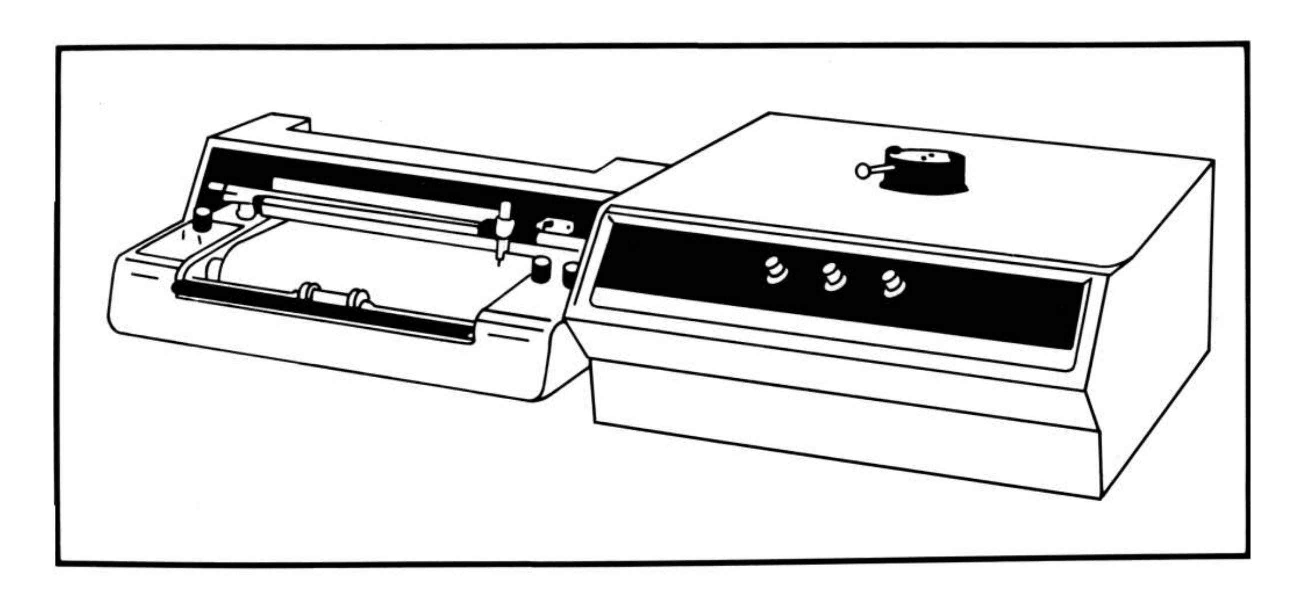
3.2 Appareillage

On peut exécuter cet essai dans un laboratoire ordinaire, propre, sous un éclairage normal. Il ne faudrait prévoir des installation spéciales qu'en fonction du degré de danger lié aux échantillons ou aux produits chimiques à expérimenter ou du risque de contamination des échantillons.

3.2.1 Photomètre

On pourrait mesurer la bioluminescence à l'aide de divers photomètres, dont un photomètre standard relié à un bain-marie (Dearborn, 1986) ou un photomètre à ATP comme celui qui a été évalué par Awong *et al.* (1989). Les analyseurs de toxicité de *AZUR* (*Microbics Toxicity Analyzers*), les modèles 2055 et 500, sont toutefois bien conçus pour exécuter les essais avec diligence dans des conditions contrôlées. On décrit ci-après le mode d'emploi de ces appareils, qui sont illustrés à la figure 2 de la page 10 (modèle 2055) et à la figure 4 de la page 37 (modèle 500). La section 4 décrit des méthodes générales ainsi que les méthodes particulières qui s'appliquent au modèle 2055. Étant donné que bien des opérations sont manuelles dans le cas de ce modèle, la section 4 vise à informer l'utilisateur des diverses étapes de l'analyse. Dans le cas du nouveau modèle 500, beaucoup d'opérations sont automatiques; les méthodes qui lui sont applicables sont décrites dans la section 5.

Avec l'analyseur de toxicité de modèle 2055, on mesure la bioluminescence des bactéries au moyen d'un photomultiplicateur à deux niveaux : 1X (pas de multiplication) et 10X (muliplication par 10). L'analyseur est plus qu'un photomètre, puisqu'il contient toutes les cuvettes nécessaires pour un essai et qu'il maintient leur contenu à une température présélectionnée. Des circuits sont intégrés de façon à permettre des mesures de la température dans les parties de l'appareil qui contiennent les solutions d'essai et les bactéries.



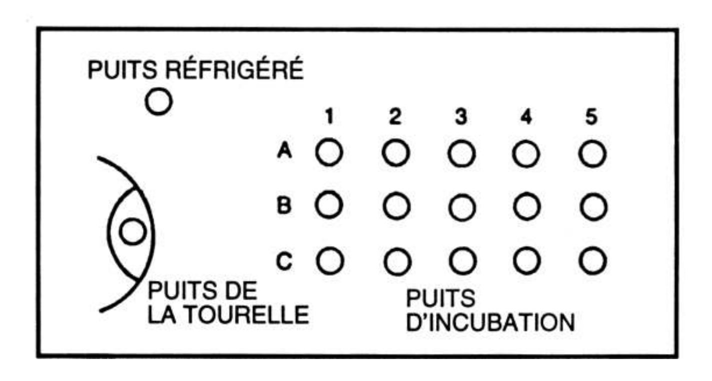


Figure 2 Aspect de l'analyseur de toxicité de AZUR (Microbics Toxicity Analyzer) de modèle 2055 et de l'enregistreur graphique. En haut de la figure, on peut voir l'analyseur de toxicité, à droite, avec sa «tourelle» qui dépasse du dessus de l'appareil et, à gauche, un enregistreur graphique. En bas, on trouve un schéma de la surface supérieure de l'analyseur, où se trouvent les puits destinés à recevoir les cuvette d'essai.

On trouvera, au bas de la figure 2, un schéma de la surface de travail de l'analyseur de modèle 2055, que toue analyste doit bien connaître. Les 15 cercles numérotés de A1 à C5 représentent les puits d'incubation, où l'on peut incuber les témoins à 15 ± 0,3° C. Le puit réfrigéré (*Precooling Well*) maintient la solution de reconstitution (*Reconstitution Solution*) et le réactif bactérien à une tempérautre de 3 à 5° C. Le puit de la tourelle (*Turret Well*) est l'endroit où se fait la mesure de la bioluminescence; on doit y placer les cuvettes à tour de rôle.

3.2.2 Autre matériel

Le matériel nécessaire à l'exécution de ces essais comprend également :

a) Un **congélateur** ou un **réfrigérateur** pour l'entreposage des réactifs. Le congélateur devrait pouvoir conserver son contenu à -20° C, et le réfrigérateur à une température se situant entre 2 et 8° C. On ne devrait pas choisir des appareils à dégivrage automatique.

b) Un **pH-mètre**.

c) Un **compteur à rebours** ou un **chronomètre.** (L'enregistreur graphique peut également servir de compteur; c'est un procédé plus facile et une méthode plus sûre.)

d) Un **enregistreur graphique** ou un **système d'enregistrement sur ordinateur**. On peut relever les valeurs de la bioluminescence directement sur l'analyseur de toxicité et les noter, mais il est avantageux d'utiliser un enregistreur. Un modèle de 25 cm, monoplume et à levier manuel conviendrait parfaitement[10].

La version 6.0 du logiciel de *SDI* permet d'enregistrer les données directement à l'aide d'un ordinateur en remplacement de l'enregistreur dans le cas du nouvel analyseur de modèle 500 (*cf.* section 5) et dans le cas des analyseurs de modèle 2055 qui sont pourvus de l'interface nécessaire.

e) Une **calculatrice** ou un **ordinateur**. Les résultats des essais peuvent être traités avec commodité en BASIC ou sur un ordinateur personnel compatible IBM; on peut se procurer le logiciel requis chez *SDI*. Il est également possible de traiter les données avec une calculatrice programmable Sharp de modèle EL-5150; toutefois, cet appareil est maintenant retiré du marché.

3.2.3 Fournitures

a) Des **récipients volumétriques en verre borosilicaté** (lavés à l'acide) pour le traitement des petits échantillons.

b) Des **cuvettes d'incubation jetables en verre**, mesurant 12 mm sur 50 mm. On les emploie comme contenants d'essai pour placer les diverses dilutions dans l'analyseur.

c) Une **cuvette de correction photométrique** (***Colour Correction Cuvette***). C'est une cuvette réutilisable, à double paroi, qui sert à la correction des valeurs de la bioluminescence dans le cas des échantillons colorés ou turbides.

3.2.4 Organismes et réactifs

Les organismes et les réactifs nécessaires sont les suivants :

a) Une **réserve de réactif bactérien** (*Microtox Reagent* ou, plus récemment, *Bacterial Reagent*). On se procure les bactéries de *SDI*, dans de petits contenants scellés renfermant environ 100 millions d'organismes lyophilisés. On devrait les

---

[10] *SDI* offre un enregistreur graphique compatible, le n° 686008; auparavant, la société recommandait l'enregistreur Beckman de modèle 2055 comme appareil complémentaire pour son analyseur de modèle 2055.

entreposer dans un congélateur, qui peut convenir pour au moins un an, ou dans un réfrigérateur, pour une durée indéterminée mais beaucoup plus courte. Losrsque les bactéries sont réactivées, *SDI* les désigne par l'expression «réactif reconstitué» (Reconstituted Reagent).

b) Une **solution de reconstitution** (***Reconstitution Solution ou Recon***). Il s'agit d'eau distillée exempte de produits toxiques (Microbics, 1989b), qui est utilisée pour réactiver les bactéries au début d'un essai. On peut l'obtenir en contenants scellés chez *SDI*. Il ne faut pas la congeler, mais on peut la conserver un an à une température de 2 à 8° C, ou pour une durée indéterminée mais plus courte à la température de la pièce.

c) Un **diluant** (***Diluent***). Il sert à diluer les échantillons pour obtenir les concentrations désirées. On peut s'en procurer chez *SDI*; il contient 2 % de chlorure de sodium dans de l'eau purifiée, et on peut l'entreposer dans les mêmes conditions que la solutions de reconstitution. Pour les essais «en phase solide», on emploie un «diluant en phase solide» spécial (Solid Phase Diluent) (*cf.* 9.3.1).

d) Une **solution d'ajustement de la pression osmotique Microtox** (***Microtox Osmotic Adjustment Solution (MOAS)***). C'est une solution de chlorure de sodium à 22 %, qui est utilisée pour amener la salinité des échantillons au niveau souhaité. On effectue généralement l'essai à une salinité d'un échantillon d'eau douce en y ajoutant cette solution, à raison d'une partie par 10 parties d'échantillon. Les exigences d'entreposage sont les mêmes que pour la solution de reconstitution.

e) Du chlorure de sodium (NaCl de qualité analytique, 99 %). On peut l'utiliser, au besoin, pour amener la salinité d'un échantillon à la valeur désirée aux fins de l'essai.

Méthodes universelles

Les méthodes décrites dans la présente section ont été conçues pour l'analyseur Microtox de mdèle 2055. Beaucoup de notions et de méthodes générales établies pour le modèle 2055 s'appliquent également au nouvel analyseur de modèle 500 mis sur le marché par *SDI* au début de 1989. Les méthodes varient toutefois au niveau des détails, et beaucoup d'étapes sont automatisées dans le nouveau modèle (cf. section 5). Les méthodes de la présente section conviennent à tous les essais décrits dans les section 6,7,8 et 9 pour des produits chimiques, des eaux usées et des sédiments ou des soudes assimilés. Tous les aspects du système d'essai décrit dans la section précédente doivent lui être intégrés. La liste de contrôle sommaire des conditions et des méthodes d'essai recommandées que donne le tableau 1 ne présente pas seulement les méthodes qui sont conçues pour des types particuliers de substances à expérimenter.

On trouvera ci-après un bref résumé de la méthode. On soumet à l'essai une série de dilutions de l'échantillon et un ou plusieurs témoins. On mesure la bioluminescence dans les cuvettes de réactif bactérien reconstitué avant l'addition de l'échantillon (solution d'essai), puis après 5 et 15 min d'exposition, et parfois après 30 min ou plus si l'on se trouve en présence d'agents toxiques à action lente. On corrige les valeurs mesurées en fonction des changements survenus dans les témoins (composés de diluant non toxique), pour tenir compte de la dérive de la bioluminescence avec le temps et des faibles effets dus à la dilution du réactif bactérien au moment où l'on ajoute l'échantillon. On analyse la courbe dose-effet, et l'on estime mathématiquement la concentration qui provoque une inhibition de 50 % de la bioluminescence.

Le résumé qui suit est divisé en catégoires et ne présente pas nécessairement l'ordre chronologique le plus efficace pour l'exécution des essais. Les guides de *SDI* fournissent des instructions dans l'ordre chronologique.

4.1 Caractéristiques de l'échantillon causant de l'interférence

4.1.1 Couleur, turbidité et particules flottables

Il faut vérifier la couleur et la turbidité de l'échantillon à expérimenter, parce que ces deux facters peuvent modifier les mesures de la bioluminescence. Il est difficile de donner des valeurs numériques précises pour les niveaux critiques de facteurs variables comme ceux-ci, mais la technique facultative de correction photométrique de Microtox est assez simple à exécuter (*cf*, 4.9), et l'analyste devrait y recouvrir s'il a le moindre doute sur la transmission de la lumière.

Si la turbidité provoque une réflexion de la lumière, cette technique de correction photométique ne convient pas. Il est préférable d'extraire les matières en suspension responsables de la turbidité, puis d'évaluer la toxicité résiduelle de la partie liquide de l'échantillon. Le filtrage pourrait être une technique satisfaisante, mais il faudrait vérifier le type de filtre à uiliser à l'aide d'un essai Microtox portant sur du diluant ayant passé dans le filtre. Selon Microbics (1988b), certains appareils ou papiers filtres peuvent augmenter la toxicité de façon mesurable, parfois en raison des agents mouillants ajoutés aux filtres. Un papier filtre pourrait également adsorber des substances toxiques, les retirant ainsi du filtrat de l'échantillon. On peut réduire la quantité de matières en suspension par centrifugation ou par quelques heures de décantation.

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées

MÉTHODES UNIVERSELLES

Type d'essai	Statique, d'une durée de 5 ou 15 min, ou encore de 30 ou 60 min, au besoin.
Espèce	*Vibrio fischeri*, souche NRRL B-11177.
Appareillage	Photomètre *SDI*, de modèle 2055 ou de modèle 500 automatisé.
Eau de contrôle/ de dilution	Solution normalisée de 2 % de NaCl dans de l'eau pure (diluant); on peut aussi utiliser du sucrose au lieu du NaCl pour augmenter la sensibilité à l'ammoniac et à certains métaux.
Température	15 ± 0,3° C.
pH	Pas d'ajustement lorsque le pH de l'échantillon se situe entre 6,0 et 8,5; en dehors de cet intervalle, ajustement facultatif, selon le but visé.
Couleur, solides ou particules flottables	Correction photométrique en présence d'une couleur vive ou de particules foncées; retrait des solides pâles; dans le cas des particules flottables, exécution de l'essai sur le liquide sous-jacent.
Oxygène/aération	Habituellement, pas d'aération des échantillons ou des concentrations à expérimenter; si la teneur en oxygène dissous est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 %, on peut opter pour une préaération de l'échantillon ou de toutes les solutions d'essai pendant au plus 20 min.
Préparation des solutions d'essai	La plus forte concentration est habituellement de 45 %, chaque concentration inférieure correspondant à la moitié de la précédente; on peut aussi exécuter des essais sur des échantillons non dilués ou presque ou sur d'autres concentrations en séries logarithmiques.
Observations	Bioluminescence au temps zéro, puis 5 et 25 min après l'introduction de l'échantillon; parfois, après 30 min ou plus d'exposition.
Résultats	CI50 après 5 et 15 min, et toute autre durée appropriée.
Produit toxique de référence	Choix de produits toxiques de référence, soumis à des essais mensuellement et sur chaque nouveau lot d'organismes; le phénol, le zinc, le bicarbonate de potassium et le lurylsulfate de sodium sont recommandés.
Validité de l'essai	Pour être valide, l'estimation numérique de la CIp devrait se fonder sur des concentrations où l'on observe des valeurs d'inhibition de la bioluminescence supérieures et inférieures à la valeur à la CIp.

PRODUITS CHIMIQUES

Solvants	Seulement dans des cas spéciaux, tout comme les autre agents de solubilisation (p. ex., les dispersants).
Concentration	Mesure de la concentration dans la solution mère (souhaitable, mais non obligatoire).

EFFLUENTS, LIXIVIATS ET ÉLUTRIATS

Transport et stockage	Lorsque les échantillons sont chauds (plus de 7° C), les ramener entre 1 et 7° C sur de la glace ou des sacs réfrigérants. Les échantillons doivent être transportés dans l'obscurité entre 1 et 7° C (de préférence à 4 ± 2° C) et être stockés à 4 ± 2° C; ils ne doivent pas geler. Les essais devraient commencer dans les 24 h et doivent commencer dans les 72 h suivant le prélèvement ou l'extraction.
Eau de contrôle/ de dilution	Diluant normal, comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; on peut choisir de l'eau de mer non contaminée dans le cas des effluents rejetés en milieu marin ou des élutriats préparés au moyen d'eau mer.

MILIEUX RÉCEPTEURS

Transport et stockage	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.
Eau de contrôle/ de dilution	Dans le cas d'eaux douces de surface, procéder comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; dans le cas d'échantillons d'eau marine, ajuster la salinité du diluant ou utiliser de l'eau de mer non contaminée; dans le cas d'eaux estuariennes, amener la salinité du diluant à celle de l'échantillon, si celle-ci est supérieure à 2 %.

SÉDIMENTS OU AUTRES SOLIDES

Transport et stockage	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.
Préparation de la substance à expérimenter	Séparer l'eau de porosité des solides par centrifugation; si on le désire, effectuer un essai avec l'eau de porosité ou un extrait aqueux, comme dans le cas des effluents.
Sédiment de référence	Essai effectué en parallèle avec un sédiment non contaminé ayant des propriétés physico-chimiques semblables.
Appareillage	Photomètre de modèle 500, ou de nodèle 2055 pourvu d'une interface avec un ordinateur.
Eau de contrôle/ de dilution	Diluant en phase solide (*Solid-Phase Diluent*) normalisé.
Observations	Comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*, sauf que la durée d'exposition est de 25 min et que la bioluminescence des bactéries exposées au sédiment de référence sert également de valeur au temps zéro pour toutes les concentrations.
Résultats	Comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; on cacule la CI50 à l'aide du programme de *SDI* relatif aux essais en phase solide.

Il n'existe pas de méthodes recommandées pour résoudre le problème des matières flottantes à la surface de l'échantillon. Il n'est pas possible de placer des dispositifs de mélange dans les cuvettes, ou sur celles-ci pendant l'essai. Toute tentative d'homogénéiser les liquides contenant des matières flottantes pendant toute la durée de l'essai pourrait provoquer la formation de gouttelettes en suspension qui nuiraient à la transmission de la lumière. Il incombe donc à l'analyste de juger de la technique à utiliser en fonction du type de matière en cause. On peut soit effectuer un essai avec le liquide sous-jacent, soit tenter d'homogénéiser la suspension, la première option étant recommandée.

4.1.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement se faire sans ajustement du pH[11]. Toutefois, on devrait mesurer le pH de l'échantillon avant l'exécution de l'essai. Il se peut que l'échantillon risque d'amener le pH d'une solution d'essai à une valeur se situant en dehors de l'intervalle de 6,0 à 8,5[12], ou que l'on souhaite évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que l'effet du pH lui-même ou l'effet modificateur du pH sur la toxicité des substances présentes dans l'échantillon; on devrait alors ajuster le pH d'une aliquote de l'échantillon avant de s'en servir[13]. On pourrait aussi faire un deuxième essai en parallèle, avec ajustement du pH.

Pour ce deuxième essai, le pH intial de l'échantillon pourrait, selon les objectifs de l'essai, être ramené à une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH du diluant ou à celui de l'eau de mer naturelle. Selon une autre démarche

---

[11] Une raison de ne pas modifier le pH de l'échantillon ou de la solution est que la valeur du pH peut influer fortement sur la toxicité de la substance à expérimenter, si l'on en juge par les résultats d'essais effectués sur des poissons et des invertébrés. La toxicité pourrait diminuer (p. ex., dans le cas de l'ammoniac, lorsqu'un pH alcalin devient neutre) ou augmenter (p. ex., dans le cas du zinc, où une eau acide ou alcaline est neutralisée). Pour les concentrations (généralement) faibles d'eaux usées qu'on trouve dans les milieux récepteurs après dilution, toute modification du pH causée par la substance à expérimenter (et toute modification concomitante de la toxicité) pourrait être acceptée comme partie intégrante de la pollution. C'est pourquoi on en arrive à la conclusion que le pH ne devrait pas être ajusté au cours des essais.

[12] Microbics (1988a) indique qu'un pH se situant entre 6,3 et 7,8 ne provoque aucune diminution de la bioluminescence. Cet intervalle est élargi dans le présent rapport, pour deux raisons. Premièrement, Krebs (1983) présente un graphique où la variation de la bioluminescence ne dépasse pa 5% dans tout intervalle de pH compris entre 5,5 et 9,0. Deuxièmement, *Vibrio fischeri* est un organisme marin; or, dans les océans, le pH a une valeur moyenne de près de 8,1 (Thurman, 1975)\, il atteint fréquemment une valeur de 8,3, et l'intervalle normale est de 7,5 à 8,5, que l'eau soit saumâtre ou salée. Puisque les laboratoires d'Environnement Canada effectuent sans doute des essais sur des échantillons d'eau de mer qui ont reçu des eaux usées, il est nécessaire que la limite supérieur du pH pour l'exécution d'essais soit d'au moins 8,3, parce que cette valeur pourrait être une condition naturelle des échantillons. Aux fins du présent rapport, la limite supérieure a été fixée à une valeur légèrement plus élevée; l'intervalle recommandé de 6,0 à 8,5 a été choisi parce qu'il se situe, à 0,5 unité près, à l'intérieur de l'intervalle d'effet nul déterminé par Krebs (1983). On pourrait dans certains cas avoir des raisons d'ajuster le pH à l'intérieur de l'intervalle recommandé, dont les raisons d'ordre toxicologique exposées dans la présente section.

[13] Le principe qui justifie un tel ajustement n'est pas en contradiction avec le raisonnement précédent selon lequel on accepte un pH divergent en tant que partie intégrante de la pollution, mais il s'appuie sur le but de l'essai. En effet, certains produits chimiques et eaux usées entraînent des niveaux de pH ayant des effets sublétaux ou létaux directs, particulièrement dans les cas d'essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il semble peu probable qu'un analyste cherche essentiellement à savoir si un pH extrême est toxique, étant donné que ce pH pourrait n'être pas représentatif des conditions qu'on observerait après une dilution, même modérée, dans le milieu récepteur. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, on pourrait l'évaluer économiquement par des mesures physico-chimiques. L'analyste cherche souvent à savoir si des substances toxiques sont présentes dans les eaux usées et, pour ce faire, il faudrait éliminer tout masquage dû à une action létale du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons à pH ajusté, de la même façon qu'on normalise la température et la salinité à des niveaux favorables dans les essais de toxicité.

admissible, on peut ramener le pH de l'échantillon à une valeur de 6,0 à 6,5 (s'il est inférieur à 6,0) ou de 8,0 à 8,5 (s'il est supérieur à 8,5)[14]. Des solutions d'acide chlohydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieure ou égal à 1 *N* devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations d'ajustement du pH. Certaines situations (p. ex., des effluents à pouvoir tampon élevé) pouraient nécessiter l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base, pour éviter une modification considérable du volume de l'échantillon ajusté.

L'ajustement du pH peut provoquer la précipitation de solides dissous qui pourraient influer sur les mesures de la bioluminescence pendant les essais; il faudrait surveiller l'apparition de ces précipités et essayer de régler le problème au besoin. (*cf.* 4.1.1).

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des ligne directrices utiles pour l'ajustement du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes d'échantillons faisant l'objet d'un ajustement du pH. Le délai nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du pouvoir tampon de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 min pour l'ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989).

Losqu'on effectue l'essai de toxicité pour mieux comprendre la nature des substances toxiques présentes dans un échantillon d'effluent, de lixiviat, d'élutriat ou de milieu récepteur, on utilise souvent l'ajustement du pH, en conjonction avec un certain nombre d'autres techniques (p. ex., l'oxydation, le filtrage, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs), pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent l'ajustement du pH parmi neuf techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui, lorsqu'on les applique à des échantillons aqueux de toxicité aiguë, constituent une méthode utile pour déterminer la nature physico-chimique des substances toxiques et leur sensibilité à la détoxication.

4.1.3 Oxygène dissous et aération

Habituellement, on ne procède pas à l'aération des échantillons ou des solutions d'essai préparées. Ce traitement n'est pas considéré comme étant nécessaire pour l'essai Microtox[15], mais on peut décider de le faire[16]. Seulement lorsque la teneur en oxygène dissous mesurée dans l'échantillon ou dans une aliquote d'une

---

[14] L'addition d'un acide ou d'une base à un échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat non dilué peut altérer de façon significative l'ionisation de certaines substances toxiques (p. ex., l'ammoniac, les acides résiniques et le zinc) et détruire l'intégrité de l'échantillon à l'essai. Si l'on décide d'ajuster le pH, il faudrait le faire avec soin juste à l'intérieur des limites fixées (soit, dans les cas présent, de 6,0 à 8,5), ou obtenir une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH du diluant ou de l'eau de mer. Il faudrait éviter les ajustements excessifs, particulièrement la neutralisation, qui consiste à augmenter ou à diminuer le pH jusqu'à une valeur de 7,0.

[15] Plusieurs laboratoires canadiens notent, tout comme *SDI*, qu'une faible teneur en oxygène, du moment qu'elle est d'au moins 1 mg/L, ne semble pas influer sur les résultats de l'essai Microtox. On pense généralement qu'une manipulation normale des échantillons et une dilution ordinaire de moitié avec des solutions aérées fournissent suffisamment d'oxygène pour l'essai, même si l'échantillon n'en contient pas assez.

[16] Beaucoup des méthodes d'essai biologique publiées par Environnement Canada (p. ex., 1990a, 1990b, 1990c, 1992a, 1992b) exigent une aération s'il y a carence ou sursaturation en oxygène, et l'option offerte ici est semblable à la méthode exigée pour ces essais. Cette option permet à un laboratoire d'exécuter, s'il le souhaite, un essai Microtox à l'aide de techniques aussi semblables que possible à celles qui sont employées dans d'autres essais. Par exemple, l'aération peut éliminer des produits chimiques volatils d'une solution ou augmenter leur taux d'oxydation ou de dégradation, ce qui modifierait la toxicité de la solution. Si l'on procédait ainsi pour un essai sur la truite arc-en-ciel, par exemple, un analyste pourrait souhaiter exécuter un essai Microtox de la même manière. Par ailleurs, on pourrait faire deux essais Microtox, avec et dans préaération, pour déterminer l'effet de ce traitement.

solution d'essai, au moment de sa préparation, est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, on pourrait aérer l'échantillon ou toutes les solutions[17] avant la mise en route de l'essai (préaération).

L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé exempt d'huile, produites au moyen d'un pipette en verre jetable; elle devrait se faire au débit minimal requis pour l'aération du récipient particulier et du volume de liquide en cause. La durée de la préaération devrait être limitée à 20 min ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans l'échantillon ou dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). Toute préaération doit être signalée dans le procès-verbal de l'essai (*cf.* section 10).

4.2 Préparation de l'essai

4.2.1 Préparation de l'analyseur de toxicité

a) S'assurer que les températures du puit de la tourelle *(Turret Well)* et de l'incubateur *(Incubator)* sont de 15 ± 0,3° C. Si ce n'est pas le cas, les ajuster à l'aide du bouton de réglage de la température *(TEMP SET).*

b) Régler le photodétecteur à 10X (multiplication). Tourner le bouton de l'étendue *(SPAN)* au maximum.

c) S'assurer que l'interrupteur de haute tension *(HV)* est en marche. Il devrait l'être quelques minutes avant qu'on passe au point d).

d) Vérifier que le photodéteceur indique bien 000 et que le voyant du signe « moins » clignote. Dans le cas contraire, l'ajuster à 000 à l'aide au bouton *ZERO*.

e) Exécuter un contrôle d'étalonnage. Régler l'étendue *(SPAN)* à 4, puis appuyer sur le bouton *CAL CHECK*, qui allume une minuscule lumière normalisée dans le puit de la tourelle. L'appareil devrait afficher une valeur entre 80 et 120; si c'est le cas, commencer l'essai en laissant les boutons dans la même position.

f) Mettre l'enregistreur en marche et ajuster la vitesse de défilement du papier à 1 cm/min. Ajuster la plume à zéro et vérifier que le photomultiplicateur de l'analyseur de toxicité indique toujours 000. On peut alors fermer l'enregistreur jusqu'au moment approprié.

g) Mettre de nouvelles cuvettes dans chaque puit qui sera utilisé. Tous les puits devraient contenir des cuvettes; on peut laisser dans leur puit les cuvettes qui ont été employées lors d'un essai précédent et ne servant pas pour l'essai en cours.

h) Si l'une des indications de l'appareil n'est pas comprise dans l'intervalle prévu ci-dessous, consulter le guide Microtox pour prendre une mesure corrective.

4.2.2 Préparation de solutions d'essai

La plupart des contenants et des outils de mesure utilisés pendant les essais (p. ex., les cuvettes et les pointes en plastique des micropipetteurs) sont jetables, et l'on présume qu'ils sont propres et prêts à l'emploi au moment où on les obtient. On pourrait avoir besoin d'autres dispositifs de mesure, d'agitateurs, etc. pour la manipulation de l'échantillon, et l'on doit les nettoyer et les rincer à fond conformément aux modes opératoires normalisés. Comme on sait que le lavage de la verrerie augmente la toxicité dans l'essai Microtox, il faut rincer à fond; on recommande également d'effectuer une vérification directe des effets de chaque technique de lavage sur les résultats de l'essai.

---

[17] Dans l'essai Microtox, il n'y aurait habituellement qu'une seule solution d'essai que l'on pourrait aérer, et ce serait celle de la concentration la plus élevée, ou l'échantillon lui-même. Les concentrations inférieures seraient obtenues par dilution dans les cuvettes.

Dans le cas des essais d'estimation de la CI50, on doit préparer au moins quatre concentrations et un contrôle ou témoin (100 % de diluant). Ces quatre concentrations représentent le nombre minimal que l'on doit utiliser pour obtenir une relation dose-effet adéquate, surtout si le degré général de toxicité de l'échantillon est inconnu. Le BNQ (1987) recommande cinq concentrations. Comme pratique courante, on aurait généralement avantage à utiliser une série appropriée de six concentrations, qui pourraient facilement être placées dans les puits d'incubation de l'analyseur standard. On utilise généralement six concentrations et un contrôle dans les laboratoires canadiens, et c'est ce que nous recommandons. Comme dans les autres essais de toxicité, les séries de concentrations normalisées suivent une progression géométrique ou logarithmique; dans ce dernier cas, chaque concentration correspond à la moitié de la précédente, la concentration la plus élevée étant de 45 %, soit la plus forte que l'on puisse utiliser avec la technique de base. On décrit ci-dessous la méthode standard de *SDI*, qui utilise quatre concentrations.

D'autre séries de concentrations pourraient mieux convenir à certains genres d'échantillons et l'on encourage leur utilisation, sans égard aux instructions standard données ci-dessous pour quatre concentrations. Comme variation la plus simple, on pourrait facilement ajouter des concentrations plus faibles à une série de dilutions de moitié, en suivant exactement la même méthode de dilution et en plaçant les cuvettes additionnelles dans les puits de la rangée C. Par ailleurs, dans les cas d'échantillons dont la toxicité est faible ou moyenne, on trouve, dans certains laboratoires, qu'une série de six concentrations plus rapprochées s'échelonant de18 à 45 % est utile pour les essais courants[18].

Voici les étapes de la préparation des solutions d'essai :

a) À l'aide d'un micropipetteur, déposer 1000 µL (1,0 mL) de solution de reconstitution dans la cuvette du puit réfrigérée *(Precooling Well).* (On prépare ainsi la reconstitution subséquente d'une fiole de réactif bactérien (*cf.* 4.3.1) en permettant à la solution de reconstitution d'atteindre la température désirée pendant les étapes suivantes.

b) Introduire du diluant dans les cuvettes. Pipetter 1000 µL de diluant dans la cuvette du puis A1 (qui contiendra le témoin) et dans les cuvettes des puits A2, A3 et A4 (qui contiendront les dilutions de l'échantillon). Pipetter 500 µL de diluant dans chacune des cinq cuvettes de la rangée B.

c) Préparer l'échantillon d'une concentration (possible[19]) de 45 % dans la cuvette A5 en y

---

[18] Cette suggestion vient de M.R. Salahub, d'Edmonton (Alberta). Par exemple, on pourrait obtenir une série de concentrations presque logarithmique (valeurs de 18, 22,5, 31,5, 38,25 et 45 %) de la façon suivante : a) ajuster au niveau requis la salinité d'une aliquote d'échantillon en y ajoutant de la solution *MOAS*; b) déposer dans les cuvettes de la rangée A des volumes de 0,80, 1,0, 1,2, 1,4, 1,7, et 2,0 mL de cet échantillon ajusté; c) porter les volumes dans les cuvettes à 2,0 mL avec du diluant; d) suivre la méthode standard de transfert dans les cuvettes de la rangée B. À noter que les anciennes versions du logiciel conçu pour l'analyseur de modèle 500 étaient limitées à des dilutions de moitié; cette restriction n'existe plus dans la nouvelle version 6.0 (*cf.* 5.2).

[19] Dans la documentation et les anciens guides, on affirme que la concentration maximale serait de 45,45 %, mais ce n'est pas exact dans le cas de la méthode standard. L'échantillon a une concentration initiale de 90,91 % dans la cuvette A5. On le dilue de moitié dans la cuvette A4, ce qui donne un échantillon à 45,45 %, mais ce dernier n'est pas utilisée pour l'essai. Voici un exemple de calcul avec la concentration la plus forte : on ajoute 0,5 mL d'échantillon à 90,91 % provenant de la cuvette A5 0,5 mL

ajoutant 200 µL de solution *MOAS*, puis 2000 µL (2,0 mL) d'échantillon. Mélanger en aspirant cinq fois du liquide dans le micropipetteur de 500 µL utilisé pour l'addition d'échantillon, puis en le remettant dans la cuvette. Jeter 200 µL du liquide.

d) Préparer les dilutions dans les cuvettes A2 à A4. Transférer 1000 µL de la cuvette A5 à la cuvette A4, puis mélanger avec le micropipetteur. Transférer ensuite 1000 µL de A4 à A3, puis de A3 à A2, en utilisant la même technique. Après avoir mélangé le contenu de la cuvette A2, jeter 1000 µL de liquide de façon à obtenir le même volume (1,0 mL) que dans la cuvette A1 et les cuvettes A3 à A5; on assure ainsi un traitement parallèle des concentrations, y compris la stabilisation de la température dans les puits. Attendre encore 5 min pour permettre au contenu des cuvettes d'atteindre la bonne température.

4.3 Mise en route de l'essai

4.3.1 Reconstitution du réactif bactérien[20]

a) Prendre une fiole de réactif bactérien dans le congélateur. Procéder immédiatement à la reconstitution en mélangeant bien les bactéries lyophilisées avec la solution de reconstitution provenant du puit réfrigéré : il faut retourner rapidement la cuvette de solution de reconstitution et en verser vite le contenu dans la fiole de réactif, car une addition lente peut provoquer la lyse des bactéries. Faire tournoyer rapidement la fiole trois ou quatre fois, puis en verser le contenu dans la cuvette qui contenait la solution de reconstitution et placer cette cuvette dans le puit réfrigéré. Mélanger à nouveau son contenu en l'aspirant à l'aide d'une pipette propre de 500 µL, puis en le remettant dans la cuvette; répéter 20 fois cette opération. Le réactif reconstitué qui se trouve maintenant dans la cuvette du puit réfrigéré suffit en théorie à l'exécution de 20 essais standard. La bioluminescence devrait demeurer forte pendant 2 h. Si l'on prévoit d'utiliser le réactif plus lontemps, il est conseillé d'inclure un produit toxique de référence dans l'essai et de surveiller tout indice d'une diminution de la bioluminescence[21].

---

de réactif dans la cuvette B5. Dès ce moment, l'essai de toxicité commence et la concentration dans la cuvette B5 est la suivante :

90,91 % · 0,5/(0.5 + 0,01) = 45,004 %

Les concentrations plus faibles obtenues ensuite sont des dilutions de moitié à partir de cette concentration, et ce sont les valeurs que l'on utilise dans le présent rapport.

[20] On gagne habituellement du temps en reconstituant le réactif bactérien au début des préparatifs et en apprêtant les solutions à expérimenter selon les instructions de la division 4.2.2 pendant la période d'attente de 15 min (point 4.3.1 *c)*).

[21] Le réactif bactérien reconstitué continue à émettre de la lumière pendant quelques heures. La période maximale d'utilisation des bactéries est variable. Dans Beckman (1982), on affirme que « l'intensité et la stabilité de la bioluminescence du réactif Microtox demeureront satisfaisantes plusieurs heures après la reconstitution ». On précise également que le mélange des bactéries dans les cuvettes (*cf.* 4.3.1 *b)*) « devrait commencer dans les 5 min qui suivent la reconstitution », parce que la sensibilité des bactéries à certaines substances toxiques pourrait changer avec le temps écoulé après la reconstitution. Dans des documents récents, on mentionne que « la sensibilité du réactif demeure essentiellement la même pour une période de 2 h après la reconstitution » (Microbics, 1989b), ou « pendant 1 à 2 h après la reconstitution », avec une surveillance de la sensibilité pour toute utilisation d'une durée supérieure, au moyen d'un essai normalisé avec du phénol (Microbics, 1991b). Qureshi *et al.* (1983) indiquent que les essais devraient commencer dans l'heure qui suit la reconstitution; ils ont constaté que la sensibiliité augmente après cette période, à mesure que la bioluminescence diminue.

Lorsqu'on utilise l'analyseur de toxicité de modèle 2055, on peut estimer la viabilité du réactif nouvellement reconstitué par une mesure de la bioluminescence 10 min après la reconstitution; on devrait obtenir un valeur de 80 ou plus, lorsque la sensibilité est réglée à 1X et que l'étendue *(SPAN)* est réglée au maximum (Microbics, 1988a). Les

b) Placer le réactif bactérien dilué dans les cuvettes de la rangée B. Ajouter 10 µL du réactif reconstitué (environ un million de bactéries) dans chacune des cinq cuvettes de la rangée B, qui contiennent déjà du diluant. (L'addition des bactéries doit se faire sous la surface du diluant, comme le prévoient les principaux guides Microtox.)

c) Attendre 15 min pour que la bioluminescence atteigne une valeur relativement stable (décroissant lentement).

4.3.2 Mesures au temps zéro
On doit mesurer la bioluminescence au temps zéro dans les cuvettes de la rangée B avant d'y ajouter l'échantillon, et l'essai de toxicité débute.

a) Fermer la tourelle et mettre l'enregistreur graphique en marche. Placer la cuvette B1 dans le puit de la tourelle et procéder à la mesure de la bioluminescence, en ajustant la sensibilité de l'analyseur de toxicité de façon à obtenir une valeur se situant entre 80 et 90.

b) Indiquer le temps zéro sur le papier graphique en appuyant sur le bouton *CAL CHECK* de l'analyseur de toxicité. Mesurer immédiatement la bioluminescence au temps zéro dans les cuvettes B1 à B5, en les plaçant à tour de rôle dans le puit de la tourelle. *SDI* désigne ces mesures par « I_0 », ce qui signifie «bioluminescence au temps zéro ». Les valeurs obtenues devraient se situer entre 80 et 100.

c) Mélanger immédiatement 500 µL provenant de chacune des cuvettes de la rangée A au contenu de la cuvette correspondante de la rangée B, c'est-à-dire de A1 à B1, de A2 à B2, etc. (Cette étape marque le début officiel de l'essai de toxicité. On laisse reposer les cuvettes jusqu'aux mesures photométriques après 5 min, 15 min, etc.). Suivre l'ordre croissant de concentration indiqué ci-dessous afin de pouvoir utiliser la même pointe pour le micropipetteur. Les concentrations exactes d'échantillon dans les cuvettes de la rangée B sont maintenant les suivantes, et l'on devrait les consigner au procès-verbal de l'essai.

B1 = 0,0 % (Contrôle ou témoin)
B2 = 5,63 %
B3 = 11,3 %
B4 = 22,5 %
B5 = 45,0 %

4.4 Observations et mesures

On devrait mesurer la bioluminescence dans chacune des cuvettes B1 à B5, 5,0 min après l'addition du liquide provenant de la cuvette correspondante de la rangée A. Procéder pour les cuvettes de la rangée B de la même manière que pour les mesures au temps zéro, et dans l'ordre où l'on a fait le mélange entre les cuvettes des rangées A et B (*cf.* 4.3.2). Il faudrait prendre soin d'effectuer la mesure pour chaque cuvette exactement **5 min** après qu'elle a reçu le liquide provenant de la rangée A. Il ne doit se glisser aucune erreur séquentielle dans les durées d'exposition due à l'exécution plus rapide ou plus lente des opérations après 5 min, par rapport à la vitesse au moment du mélange. *SDI* désigne par

---

guides n'indiquent pas si l'on peut se servir du même critère pour déterminer le moment où le réactif reconstitué n'est plus utilisable.

Des utilisateurs de l'essai Microtox ont indiqué que l'on peut employer le réactif pendant 4 à 6 h, à condition de contrôler adéquatement (de façon périodique) la performance et les résultats. Certains utilisateurs analysent les échantillons en double, incluant un produit toxique de réference dans chaque essai, ou ont recours à ces deux méthodes à la fois. Les analystes qui utilisent l'analyseur de toxicité de modèle 2055 devraient également surveiller les changements dans le réglage de l'étendue *(SPAN)* au début de l'essai, le degré d'ajustement du *SPAN* nécessaire entre les essais, et les rapports des témoins. Il est recommandé de prendre ces précautions, et surtout d'effectuer les essais avec un produit toxique de référence, si le réactif bactérien est utilisé après une période de 2h.

« I_5 » les valeurs de la bioluminescence après 5 min.

Répéter les mesures après 15 min d'exposition totale.

Des substances toxiques à action lente, par exemple des métaux bivalents, pourraient être présentes dans les échantillons dont la toxicité est inconnue. Souvent, il est souhaitable de prendre une autre mesure après 30 min d'exposition; parfois, il pourrait aussi s'avérer utile d'en prendre d'autres après 45 ou 60 min. En analysant les séries de mesures, l'analyste peut déterminer : *a)* si la bioluminescence diminue encore de façon significative (soit de plus de 10 % depuis la dernière mesure), auquel cas on devrait poursuivre l'exposition jusqu'à une nouvelle mesure; ou *b)* si la diminuation s'est interrompue, auquel cas on peut mettre fin à l'essai. Le but est de laisser à l'échantillon assez de temps pour que son effet inhibiteur atteigne un niveau maximal, sans poursuivre l'exposition plus longtemps que nécessaire une fois que l'on a atteint le « plateau » au-delà duquel il n'y a plus d'inhibition additionnelle appréciable. Étant donné que les valeurs mesurées pour le témoin (et pour les concentrations à expérimenter) diminuent graduellement avec le temps, il faut en tenir compte lorque l'on évalue les diminutions dans les cuvettes d'échantillon, et la meilleure manière de le faire est la méthode statistique de calcul de la valeur de γ décrite dans la sous-section 4.5. De toute manière, il n'est pas souhaitable de prolonger l'exposition sans nécessité, et la *CI50 après 15 min devrait être considérée comme étant le résultat normal.* Dans des cas spéciaux, les bactéries pourraient récupérer et la bioluminescence augmenter après une exposition plus longue; on devrait alors utiliser les premières données.

Si l'échantillon est plus toxique que prévu ou s'il l'est moins, il se pourrait que toutes les concentrations inhibent la bioluminescence de plus de 50 % ou de moins de 50 %. Dans les deux cas, il faudrait reprendre l'essai avec des concentrations plus appropriées.

4.5 Résultats et calculs

On doit consigner les mesures de la bioluminescence. Si l'on utilise un enregistreur graphique à cette fin, on peut en extraire les valeurs ultérieurement. L'annexe C contient un exemple de formulaire d'enregistrement des données, et la section 10 présente la liste des points à inscrire au procès-verbal.

Le résultat est la concentration à laquelle on observe 50 % d'inhibition de la bioluminescence, c'est-à-dire la CI50. Pour estimer la CI50 après 5 min, on doit effectuer les calculs exposés ci-après. On suivrait les mêmes étapes pour calculer les valeurs de la CI50 après 15 ou 30 min.

a) Calculer le rapport du témoin, c'est-à-dire la proportion de la bioluminescence initiale qui reste dans le témoin après un temps donné. On ne fait cette mesure, et la calcul du rapport correspondant, qu'avec la cuvette B1, soit la cuvette du contrôle ou du témoin.

Il se produit naturellement une légère diminution de la bioluminescence au cours de l'essai. On doit tenir compte de ce facteur dans l'évaluation de la perte de lumière due à la toxicité. Le rapport du témoin permet de faire cette correction.

Rapport du témoin $R_5 = I_5 / I_0$

où : I_0 = lumière émise par le témoin au temps zéro
I_5 = lumière émise par le témoin après 5 min

b) Calculer la valeur de γ (gamma), c'est-à-dire la mesure de la perte de luminescence qu'on utilise dans le calcul de la CI50. Elle est calculée séparément pour chaque cuvette qui

contient une quantité de l'échantillon à expérimenter.

Plus précisément, la valeur de γ d'une cuvette donnée après une durée d'exposition particulière est le rapport entre la quantité de la lumière perdu à cause de la toxicité et la lumière restante à ce moment[22].

$$\gamma = \text{(lumière perdue)/(lumière restante)} = [(R_5 \cdot I_0) - I_5]/I_5 = [(R_5 \cdot I_0)/I_5] - 1$$

où : I_0 = lumière émise au temps zéro
I_5 = lumière émise après 5 min
R_5 = rapport du témoin

Une valeur de γ égale à l'unité (1) indique qu'il y a eu perte de la moitié de la production de lumière à cause de la toxicité, ce qui correspond à la CI50.

4.5.1 Estimation de la CI50 à l'aide d'un graphique

Les valeurs de γ sont inscrites sur l'axe vertical d'un papier logarithmique, les concentrations correspondantes de l'échantillon étant portées sur l'axe horizontal (Microbics, 1992). Après avoir tracé une ligne ajustée à l'oeil, on détermine la CI50, qui est la concentration correspondant à une valeur de γ égale à 1,0 (*cf.* figure 3).

La CI50 devrait être une mesure d'interpolation, c'est-à-dire qu'il faudrait observer au moins une concentration causant plus de 50 % d'inhibition de la bioluminescence (soit une concentration supérieure à la CI50) et, au moins une concentration causant moins de 50 % d'inhibition. La section 4.8.5 contient plus de détails sur la nécessité de faire une interpolation et sur l'utilisation de résultats tels que la CI20 au lieu de la CI50.

L'exactitude de cette méthode repose sur l'habileté de l'analyste à ajuster une ligne à l'oeil. C'est pourquoi il est habituellement souhaitable de prendre une méthode qui utilise un ordinateur ou une calculatrice comme méthode principale d'estimation de la CI50 (*cf.* 4.5.2). Néanmoins, on devrait intégrer systématiquement une analyse graphique à chaque essai, pour vérifier la vraisemblance de la CI50 calculée. La préparation d'un graphique est particulièrement utile pour détecter, dans les données, des anomalies qui pourraient inciter à faire une étude plus poussée ou diminuer la fiabilité des résultats. Tout écart important entre la CI50 calculée et celle que l'on obtient d'après le graphique devrait être résolu.

Si l'on a saisi manuellement les données dans un ordinateur, l'établissement d'un graphique à la main est également utile pour le repérage de données incorrectes, car toute erreur pourrait passer inaperçue autrement. Le logiciel de *SDI* peut afficher les données intermédiaires et produire un graphique pratique, sur demande. Si l'on se sert de données saisies manuellement pour créer un graphique sur ordinateur, on devrait vérifier les points de données par rapport aux valeurs observées, pour éviter les erreurs de saisie et les évaluation anormales de la CI50. De telles erreurs pourraient être repérées par une vérification au moyen d'un graphique tracé manuellement.

4.5.2 Estimation de la CI50 à l'aide d'une calculatrice ou d'un ordinateur

L'analyste pourrait tracer une droite correspondant au rapport qui existe entre le logarithme de γ et celui de la concentration par

---

[22] La valeur de γ représente la proportion de la lumière perdue par rapport à la lumière restante. On peut utiliser une mesure plus simple, comme la quantité absolue de lumière perdue à cause de la toxicité, mais on obtient généralement une meilleure relation linéaire en traçant un graphique du logarithme de γ par rapport au logarithme de la concentration. La valeur de γ est donc préférable pour décrire la courbe dose-effet et estimer la CI50 ainsi que les limites de confiance. On trouvera dans Beckman (1982) un exemple où les deux méthodes sont comparées.

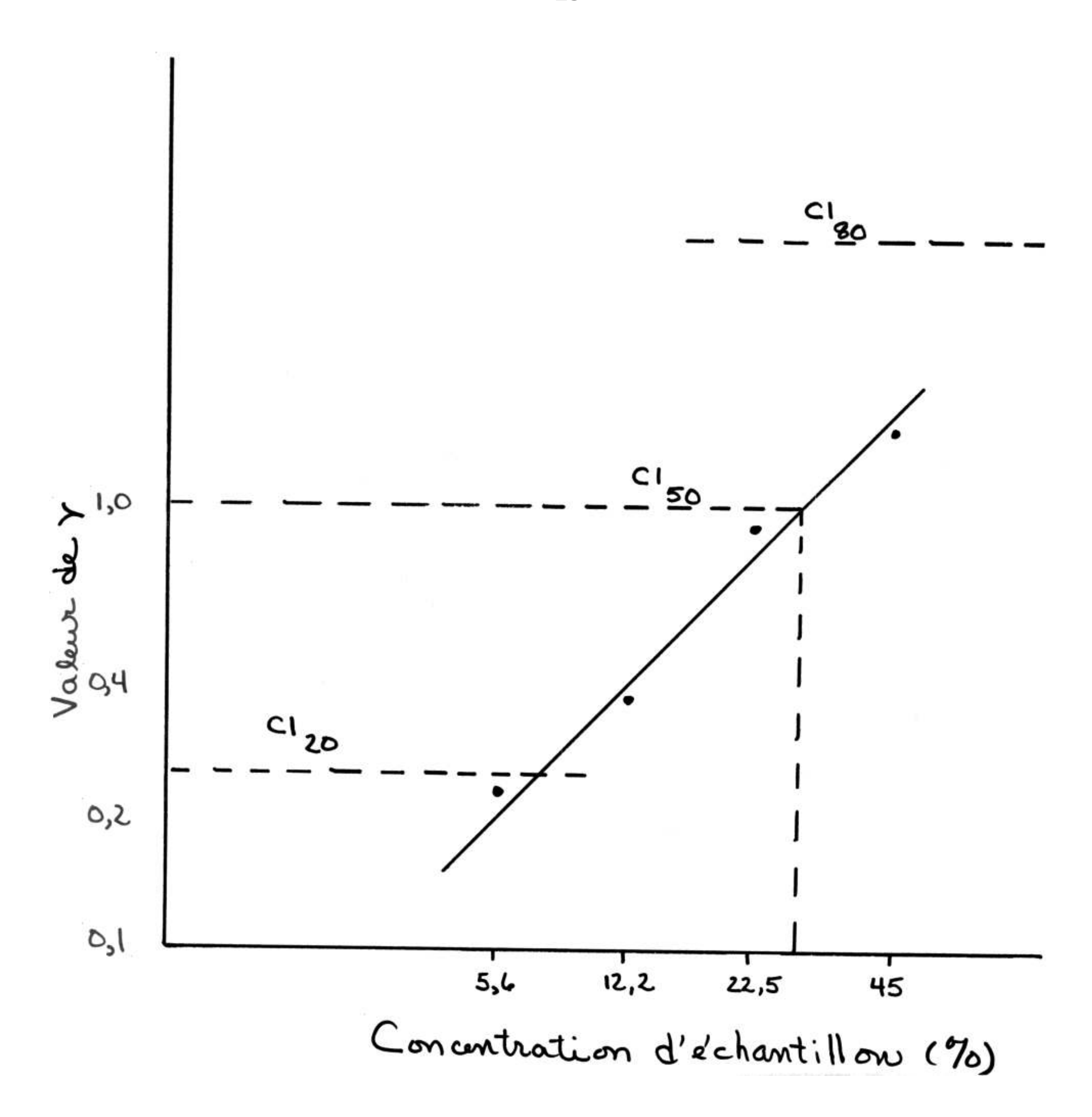


Figure 3 Exemple d'estimation de la CI50 à l'aide d'un graphique tracé à la main sur du papier logarithmique

On peut déterminer sur le graphique la concentration qui cause 50 % d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*. L'exemple hypothétique ci-dessus porte sur quatre concentrations. On peut déterminer la concentration qui causerait 50 % d'inhibition en partant d'une valeur de 1,0, qui représente 50 % de réduction, et en se déplaçant (ligne pointillée dans le graphique) jusqu'à l'intersection de la droite d'ajustement, puis vers le bas jusqu'à l'axe horizontal, pour obtenir une CI50 d'environ 28 %. On pourrait estimer la CI50 de la même façon si on le désirait, maus il faudrait analyser des concentrations plus élevées avant d'estimer la CI80 (*cf.* 4.8.5).

des méthodes mathématiques d'usage courant; cependant, les guides Microtox ne couvrent pas ces étapes en détail. Il semble que le programme informatique de *SDI* utilise une méthode de régression des moindres carrés pour le calcul de la CI50; on pourrait donc trouver dans tout manuel de statistique la marche à suivre pour faire le calcul manuellement. Les valeurs de γ et des concentrations devraient d'abord être transformées en logarithmes naturels ou décimaux. À noter que les programmes informatiques de calcul des concentrations létales médianes (CL50) ou des concentrations efficaces médianes (CE50), que l'on peut se procurer facilement, s'appliquent uniquement à des données de type « tout ou rien » et *ne peuvent donc pas* être utilisés avec les données de l'essai Microtox.

On recommande le logiciel de *SDI* comme méthode analytique de choix, étant donné que les ordinateurs personnels sont très répandus dans les laboratoires canadiens. *SDI* fournit ce logiciel en langage BASIC, qui est compatible avec les ordinateurs personnels IBM. Le logiciel de *SDI* est conçu en fonction du nouveau modèle 500 de l'analyseur Microtox (*cf.* section 5), mais il peut également être utilisé avec le modèle 2055. Avec le modèle 500, le logiciel transfère automatiquement à un ordinateur les mesures photométriques prises au cours de l'essai, et il peut également le faire avec le modèle 2055 si celui-ci est doté d'un adapteur conçu à cette fin.

Le programme informatique s'adapte à diverses conditions, dont différentes gammes de concentrations; en fait, il peut traiter les données de tous les types d'essais étudiés dans le présent rapport. Il existe des options d'impression des étapes intermédiaires des calculs, mais habituellement, l'imprimé contient des détails sur la substance analysée, une description des principales variables de l'essai, les valeurs des concentrations et de γ, une estimation de la CI50 et de ses limites de confiance, ainsi qu'un graphique présentant les observations et la droite d'ajustement. Lorsqu'on utilise le programme informatique, il est impératif de vérifier la vraisemblance des mesures de réduction de la bioluminescence et de l'estimation de la CI50. L'impression des étapes intermédiaires des calculs aide à effectuer ce contrôle[23].

Dans la section 4.8.5, on explique pourquoi il est souhaitable de fonder les calculs sur des valeurs mesurées qui sont supérieures et inférieures à 50 % de réduction de la bioluminescence. On y traite également d'autres résultats qui pourraient s'avérer utiles, comme la CI50.

4.6 Produit toxique de référence

L'utilisation courante d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence est nécessaire à l'évaluation, dans des conditions d'essai normalisées, de la sensibilité relative des bactéries après reconstitution, de l'exactitude des techniques de dilution et des autre facteurs influant sur la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire pour ce ou ces produits (Environnement Canada, 1990d). On devrait analyser un ou des produits toxiques de référence au moins une fois par mois où l'on fait des essais Microtox ainsi qu'à la première utilisation d'un nouveau lot ou d'un nouvel envoi de réactif bactérien. Les conditions d'essai et les méthodes d'analyse devraient être les mêmes que d'habitude, telles que décrites dans le présent rapport et dans la documentation de SDI.

---

[23] Le comité des utilisateurs de l'essai Microtox dans l'Ouest canadien *(Western Canada Microtox Users Committee)* a analysé des donnés à l'aide de différents programmes informatiques et a obtenu des résultats très similaires. Toutefois, pour les donnés extrapolées, on observe plus de variabilité dans les résultats des différents programmes. Les analystes auraient avantage à effectuer des vérifications internes par divers méthodes et à comparer lesurs techniques et leurs résultats avec ceux d'autres laboratoires par l'entremise de regroupements non officiels comme le comité des utilisateurs dans l'Ouest.

Les critères appliqués au choix des produits toxiques de référence convenant à ces essais sont les suivants :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour l'essai Microtox;
- influence connue du pH sur la toxicité du produit, le cas échéant.

Quatre produits chimiques sont recommandés comme produits toxiques de référence pour l'essai Microtox, et les laboratoires peuvent en utiliser un ou plusieurs.

Le phénol de qualité « réactif » est l'un de ces produits. *SDI* précise que, pour le phénol, la CL50 après 5 min pour les valeurs comprises entre 13 et 26 mg/L devrait être atteinte à 15° C. Kaiser et Ribo (1988) ont relevé dans diverses études 11 valeurs se situant à 30 mg/L. La solution mère de phénol devrait être préparée le jour de l'essai.

On peut également utiliser du sulfate de zinc ou du bicarbonate de potassium comme produits toxiques de référence, tous deux s'étant révelés satisfaisants dans des laboratoires du Canada. *SDI* recommande l'utilisation de zinc, la CI50 approximative après 5 min se situant entre 1,4 et 2,7 mg/L à 15° C. Le chrome contenu dans le bichromate de potassium est cancérogène, et il faudrait le manipuler en prenant certaines précautions (Environnement Canada, 1990d). Le laurylsulfate de sodium est un autre choix possible. Le BNQ (1987) en recommande l'utilisation, les concentrations d'essai suggérées couvrant l'intervalle de 0,5 à 25 mg/L; Kaiser et Ribo (1988) ont relevé sept CI50 dont la moyenne géométrique se situe à 1,3 mg/L. Cette substance ne fait pas partie de la liste des produits toxiques de référence recommandés par Environnement Canada (1990d).

Les concentrations des produits toxiques de référence dans les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Le calcul de la CI50 devrait être fondé sur les moyennes géométriques des concentrations mesurées, si ces moyennes diffèrent sensiblement (c.-à-d., de 20 % ou plus) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

Un carte de contrôle (Environnement Canada, 1990d) devrait être établie et mise à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Les CI50 successives sont portées sur cette carte; on les examine afin de savoir si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de plus ou moins deux fois l'écart-type des valeurs obtenues lors des essais précédents. On recalcule la moyenne géométrique des CI50 est ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart-type, selon une base géométrique [logarithmique][24]) pour chaque CL50 successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1989a; Environnement Canada, 1990d).

Lorsqu'une CL50 s'inscrit en dehors des limites de contrôle, le réactif, le système d'essai ou la technique sont suspect. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une valeur qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faille mettre en question la sensibilité du réactif ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela pourrait être le cas. Il serait sage d'effectuer une vérification minutieuse de toutes les conditions de détention et d'essai et d'envisager l'utilisation d'un nouveau lot de réactif bactérien.

---

[24] Lorsqu'on ne peut obtenir une distribution log-normale des CI50, il se peut qu'une moyenne arithmétique accompagnée d'un écart-type se révèle plus appropriée.

Le recours à des limites de contrôle n'indique pas nécessairement qu'un laobratoire produit des résultats constants. Un laboratoire qui produirait des résultats extrêmement variables pour un produit toxique de référence aurait des limites de contrôle très larges; un nouveau point de données pourrait se situer à l'intérieur des limites de contrôle, mias il n'en représenterait pas moins une variation non souhaitable des résultats obtenus dans les essais. Environnement Canada (1990d) suggère comme limite, à titre provisoire, un coefficient de variation de 20 ou 30 %. Cela semble un intervalle raisonnable, mais, pour établir une limite des variations admissibles des résultats, il faudrait accumuler davantage de données sur la reproductibilité que les laboratoires canadiens peuvent atteindre au cours d'essais Microtox portant sur divers produits toxiques de référence, dans des conditions d'essai normales.

4.7 Considérations juridiques

Au moment de la rédaction du présent rapport, des essais de toxicité utilisant des bactéries ont été imposés à une industrie dans au moins deux provinces canadiennes. Il convient donc de formuler des commentaires sur l'utilisation de l'essai Microtox à des fins de réglementation. La détermination des résultats de l'essai à des fins juridiques dépasse la portée du présent rapport; on peut toutefois recommander certaines pratiques générales utiles.

Si les données des essais sont suceptibles d'être utilisées aux fins de poursuites judicaires, on doit veiller à ce que les échantillons soumis à l'essai soient recevables en preuve. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; être identifiés avec précision (date, heure et lieu d'origin); être accompagnés de documents établissant clairement la chaîne de possession; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de la rédaction du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas de procédures judiciaires (McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

4.8 Écarts par rapport aux méthodes de base

4.8.1 Essai de détermination de l'ordre de grandeur

Il est généralement utile d'évaluer, par un essai préliminaire, la toxicité approximative d'un échantillon de toxicité inconnue. Les résultats peuvent démontrer l'à-propos d'un essai final à des concentrations plus faibles que les concentrations standard, ou dans un intervalle plus étroit (facteur plus faible entre les concentrations; *cf.* 4.2.2).

On peut exécuter rapidement cet essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur (Microbics, 1983, n° M101; 1988a) en ajoutant 10 µL d'échantillon à une cuvette standard contenant, comme dans la méthode de base, 500 µL de diluant et 10 µL de réactif bactérient reconstitué; on obtient ainsi une dilution à 2 % environ de l'échantillon. Une réduction de la bioluminescence de 60 % après 5 min indiquerait une toxicité extrême de l'échantillon.

En général, lorsque la bioluminescence diminue de 60 % en 5 min au cours de l'essai préliminaire, on recommande une dilution au dixième de l'échantillon avant les préparatifs habituels de l'essai Microtox (*cf.* 4.2). Si la réduction de la bioluminescence était comprise entre 20 et 60 % au moment de l'essai préliminaire, on procéderait à une dilution initiale au cinquième. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur est suffisamment rapide pour être fait pendant la période de stabilisation de la bioluminescence; il suffit de préparer quelques cuvettes supplémentaires de diluant et de réactif reconstitué, que l'on place dans la rangée C de l'analyseur.

4.8.2 Répétitions

À titre de précaution, on recommande de préparer une répétition de la solution de contrôle, car une mesure anormale dans une seule cuvette témoin fausserait le résultat global.

Si on le désire, on peut préparer des répétitions des concentrations soumises à l'essai d'après leur expérience d'ensemble, les laboratoires canadiens concluent que cela n'est pas nécessaire (*cf.* 3.1.1). Les répétitions pourraient être placées dans les puits de la rangée C et subir les mêmes opérations que les solutions dans les cuvettes de la rangée A. Dans la section 4.2.2, les modifications suivantes seraient apportées à la méthodes de base. À l'étape *b)*, on ajouterait 1500 µL (au lieu de 1000 µL) de diluant aux cuvettes A1 à A4. À l'étape *c)*, on ajouterait à la cuvette A5 3000 µL d'échantillon et 300 µL de solution *MOAS*. La quantité transférée à l'étape *d)* serait de 1500 µL au lieu de 1000 µL. Au point 4.3.2 *c)*, on effectuerait ensuite des transferts dans les cuvettes de la rangée C à partir de la rangée A, de la même façon et en mesurant les mêmes volumes de liquide qu'on l'a fait pour les transferts dans la rangée B.

4.8.3 Échantillon non dilué

La concentration la plus élevée dans la méthode de base est de 45 % (*cf.* 4.2), mais, parfois, un analyste pourrait souhaiter analyser un échantillon non dilué ou presque. Il est possible d'analyser un échantillon d'une concentration de 90 % en omettant l'addition de diluant et en ajustant la salinité de l'échantillon avec la solution *MOAS*. On peut aussi analyser un échantillon pratiquement non dilué en n'y ajoutant pas de diluant ni de solution *MOAS*, et en utilisant des cristaux NaCl de qualité analytique pour amener sa salinité à 2 %. La bioluminescence au temps zéro ne peut être mesurée dans ce cas, puisque le réactif est ajouté directement à l'échantillon. La diminution de la bioluminescence dans chaque dilution de l'échantillon est estimée par comparaison avec un témoin de diluant. *AZUR* (Microbics, 1989b) recommande de ne pas faire d'essais avec des échantillons non dilués présentant une forte toxicité (c.-à-d. dont la toxicité est encore mesurable dans des dilutions); la précision pourrait être moins bonne, cas les essais sur de tels échantillons présentent une sensibilité très élevée à la technique employée par l'analyste.

La méthode d'analyse d'un échantillon non dilué est en fait très semblable à celle qui est décrite aux étapes *a)* à *d)* de la section 4.2.2 et aux étapes *a)* à *c)* de la section 4.3.1, mais nous la répéterons ci-dessous. Il s'agit essentiellement de la méthode décrite par *AZUR* (Microbics, 1989b), sauf que l'on utilise une seule série de cuvettes (A1 à A5). On trouvera dans Dutka (1988) les grandes lignes d'une méthode similaire s'appliquant à plusieurs répétitions pour un échantillon à 99 %.

a) Déposer 1000 µL de solution de reconstitution dans une cuvette dans le puit réfrigéré.

b) Mettre 1000 µL de diluant dans les cuvettes A1, A2, A3 et A4.

c) Déposer 200 µL de solution MOAS dans la cuvette A5, pour l'échantillon à 90 %.

d) Ajouter 2000 µL d'échantillon à la cuvette A5, mélanger et jeter 200 µL.

e) Transférer 1000 µL de A5 à A4 et mélanger A4.

f) Transférer 1000 µL de A4 à A3 et mélanger A3.

g) Transférer 1000 µL de A3 à A2, mélanger A2 et jeter 1000 µL.

h) Attendre 5 min pour laisser la température se stabiliser.

i) Reconstituer une fiole de réactif bactérien de la manière habituelle (cf. 4.3.1 *a)*).

j) Faire démarrer le chronomètre. Transférer 10 µL de réactif reconstitué dans chacune des cinq civettes A1 à A5[25], et mélanger dans le même ordre à l'aide d'un micropipetteur de 500 µL.

k) Après 5 min et 15 min, effectuer une mesure de la bioluminescence dans chaque cuvette et faire les compilations et les calculs nécessaires en comparant les cuvettes A2 à A5 à la cuvette témoin A1. Les concentrations, en ordre décroissant, sont les suivantes : 90,0, 45,0, 22,5, 11,3 et 0 %.

Pour analyser un échantillon non dilué, ne pas mettre de solution *MOAS* dans la cuvette A5, à l'étape *c).* Déposer plutôt 40 mg de NaCl sec dans cette cuvette et le dissoudre dans l'échantillon ajouté. Ne pas jeter de liquide de la cuvette A5 à l'étape *d).* La concentration d'essai de la cuvette A5 est proche de celle de l'échantillon non dilué. En raison de l'addition de réactif, on peut considérer que l'échantillon a une concentration de 99 %[26].

4.8.4 Utilisation de sucrose pour ajuster la pression osmotique

La sensibilité du système Microtox à certains métaux et à l'ammoniac peut être accrue par l'emploi de sucrose, au lieu de chlorure de sodium, comme base de diluant. *SDI* (Microbics, 1988c) précise que le facteur de réduction de la CI50 est de 34 en présence de sels de cadmium, de 36 en présence d'un sel d'ammoniac et de 15, 10 et 10 en présence de sels de nickel, de cuivre et de zinc, mais que la CI50 varie peu en présence de sels d'arsenic, de chrome et de mercure. De plus, le diluant au sucrose ne réduit pas la sensibilité de l'essai Microtox à d'autres types de substances toxiques analysées (phénol, octanol, xylène et cyanure de potassium). Ankley *et al.* (1990) ont confirmé des augmentations importantes de la sensibilité au zinc et au nickel en présence de sucrose, mais ils ont observé peu de différences dans le cas du cuivre et ils ont obtenu des résultats semblables pour la plupart des 44 effluents non dilués qu'ils ont soumis à l'essai.

Cette adaptation de la méthode Microtox conviendrait manifestement à l'analyse de métaux et de l'ammoniac à l'état de produits chimiques purs. Elle pourrait également être utile comme complément de la méthode de base dans le cas des effluents et des autres échantillons environnementaux dans lesquels certains métaux ou l'ammoniac pourraient être des causes importantes de toxicité.

La méthode à utiliser comporte peu de changements par rapport à la méthode de base. Au lieu de la solution *MOAS*, on doit ajouter 2 g de sucrose solide (qualité ACS) à 10 mL de l'échantillon, puis transférer 2 mL de cet échantillon modifié dans la cuvette A5. Au lieu du diluant habituel, on ajoute 1000 µL de diluant au sucrose (solution à 20 % de sucrose) à chacune des cuvettes A1 à A4, et 500 µL à chacune des cuvettes B1 à B5. On fait ensuite la série de dilutions, le mélange avec le réactif et la mesure des résultats en suivant la méthode générale. Les concentrations soumises à l'essai dans les cuvettes B2 à B5 sont respectivement de 6,19, 12,4, 24,8 et 49,5 %.

4.8.5 Autres résultats

Qu'on estime la CI50 à l'aide d'un graphique ou encore d'une calculatrice ou d'un ordinateur, il est possible d'estimer des concentrations causant d'autre pourcentages d'effet, comme la CI20 ou la

---

[25] Il est important que le réactif bactérien ne soit pas contaminé par l'échantillon toxique par l'intermédiaire du micropipetteur. Il faut donc changer la pointe après chaque trasfert.

[26] Si la concentration était calculée en fonction de la masse et corrigée pour tenir compte du sel ajouté, elle serait de 97,1 %.

CI80. Bien que l'on recommande, dans le présent rapport, d'utiliser la CI50 comme mesure d'effet standard, on pourrait évaluer les concentrations causant des pourcentages d'effet différents si cela s'avérait approprié à des fins particulières. On devrait cependant toujours indiquer la CI50 dans le procès-verbal de l'essai, si on peut l'estimer. Des limites de confiance à 95 % devraient également être calculées pour toute estimation à d'autres pourcentages d'effet. On ne devrait pas pousser cela à l'extrême; il serait illusoire de tenter de calculer un « seuil de toxicité » tel que la CI1 ou la CI0,1. D'après une longue série d'essais, dont on a parlé à la section 3.1.1, le ministère de l'Environnement du Québec a conclu que 17 % d'inhibition de la bioluminescence est le pourcentage minimal pouvant être quantifié tout en ayant une signification statistique (BNQ, 1987). Une réduction de 20 % correspond à une valeur de γ de 0,25, et la CI80 correspond à une valeur de γ de 4,0; on trouvera dans Beckman (1982) d'autres correspondances de ces valeurs.

Les estimations d'une concentration inhibitrice particulière (CI50, CI80, etc.) devraient être calculées uniquement lorsqu'on a obtenu des pourcentages d'effet à des concentrations supérieures et inférieures. Dans tout essai de toxicité, le résultat le plus fiable se situe dans l'intervalle des concentrations qui ont été analysées et qui ont fourni des données utiles. En particulier, il n'est pas souhaitable de faire une extrapolation en vue d'estimer une CI50 à partir de données qui n'indiquent que des effets se situant en deçà de 50 %. Par conséquent, pour qu'une concentration inhibitrice à un pourcentage d'effet donné soit valide aux fins d'Environnement Canada, nous recommandons qu'elle comporte au moins un point de données qui soit supérieur à ce pourcentage[27].

Les extrapolations peuvent fournir certains renseignements, particulièrement dans la méthode de base où la concentration la plus élevée est de 45 %; en effet, comme la CI50 la plus élevée considérée comme valide se situereait à environ 45 %, on pourrait évidement dire dans ce cas que « la CI50 est supérieure à 45 % ». D'un autre côté, il pourrait être possible et utile d'estimer la CI20 plutôt que la CI50. Une CIp obtenue par extrapolation pourrait servir à des fins de comparaison générale, par exemple pour établir le degré de toxicité relatif de divers effluents. Tout résultat de ce type devrait être clairement qualifié de « prévu », « d'extrapolé » , ou d'un autre adjectif approprié.

4.9 Méthode applicable aux échantillons colorés ou turbides

On devrait effectuer l'essai de toxicité sur diverses concentrations de l'échantillon en suivant la méthode habituelle, puis procéder à une correction en utilisant la méthode exposée ci-après. On emploie pour cela la cuvette de correction photométrique (*Colour Correction Cuvette* ou *CCC*), qui est une cuvette à double paroi, c'est-à-dire formée d'un tube étroit inséré dans un tube de dimensions normales; elles est réutilisable et on peut se la procurer chez *SDI*. Pour transférer du liquide sans former de bulles, on se sert de la pipette d'aspiration fournie avec la cuvette ou d'une autre pipette à pointe longue. On ne peut utiliser cette méthode avec les échantillons qui réfléchissent la lumière, ni avec l'analyseur de modèle 500, qui nécessite des volumes d'échantillons différents.

---

[27] *SDI* (Microbics, 1983, n° M110) soutient que l'on peut extrapoler avec un certain degré de certitude dans l'essai Microtox, parce que cet essai mesure un taux d'activité biologique plutôt qu'un effet par « tout ou rien » tel que la mort de poissons dans un essai de létalité. Cette affirmation est vraie jusqu'à un point, mais il pourrait ne pas être toujours exact de supposer qu'une relation linéaire à de faibles concentrations continue avec la même pente à de fortes concentrations, ou vice-versa. Par exemple, on trouve dans Beckman (1982) quelques graphiques logarithmiques non linéaires de la valeur de γ par rapport à la concentration. Des analystes canadiens ont aussi signalé l'obtention de telles courbes irrégulières.

Une fois que l'essai ordinaire est fait avec l'échantillon, on procède comme suit :

a) Mettre 1500 µL de diluant dans la chambre extérieure de la *CCC* et placer celle-ci dans le puit C1. Mettre 1000 µL de diluant dans une cuvette ordinaire dans le puit C2 et 1500 µL dans le puit C4.

b) Introduire 1500 µL d'une concentration donnée de l'échantillon dans une cuvette standard dans le puit C3. Normalement, il s'agirait de la concentration la plus élevée qui a donné des résultats utilisables dans l'essai que l'on vient de terminer, ou de la concentration la plus proche de la CI50 que l'on vient de déterminer. Attendre au moins 5 min pour que la température se stablise.

c) Ajouter 50 µL de réactif reconstitué à la cuvette C2 et mélanger. Attendre au moins 10 min pour qu'il y ait stabilisation de la bioluminescence.

d) À l'aide de la pipette d'aspiration, déposer du liquide de la cuvette C2 dans la chambre intérieure de la *CCC*, jusqu'à un niveau égal à celui du liquide de la chambre extérieure.

e) Placer la *CCC* dans le puit de la tourelle. Ajuster la cellule photoélectrique pour que la mesure soit de 90 % environ et enregistrer les mesures jusqu'à ce qu'il soit évident que le taux de diminution est stable, puis grader les mesures des quatre dernières minutes pour les calculs.

f) Sans déplacer la CCC, enlever le diluant de la chambre extérieure au moyen de la pipette d'aspiration, puis transférer 1500 µL de la concentration à expérimenter de la cuvette C3 à la chambre extérieure. Enregistrer les mesures de la bioluminescence jusqu'à ce qu'il soit évident que le taux de diminuation est stable; ici encore, on ne garde que les mesures des quatre dernières minutes pour les calculs.

g) Sans déplacer la CCC, enlever l'échantillon de la chambre extérieure à l'aide de la pipette d'aspiration, puis la remplir de diluant provenant de la cuvette C4.

h) Sur l'enregistrement graphique, mesurer la perte de transmission de la lumière attribuable à l'échantillon au moyen de la méthode graphique de *AZUR* (Microbics, 1988b). La mesure faite sur l'échantillon (I_f) correspond simplement à la dernière mesure enregistrée à l'étape *f)* (en haut à droite). On détermine par interpolation la transmission de la lumière avec le diluant (*Ip*) au moment de la mesure prise sur l'échantillon. Pour ce faire, on trace des lignes droites sur trois mesures apparaissant sur l'enregistrement graphique : une ligne qui joint les dernières mesures (en haut à droite) faites aux étapes *e)* et *g)*, puis une droite tracée vers le haut à partir de la mesure finale (en haut à droite) faite à l'étape *f)*. L'intersection de ces lignes donne la valeur *Ip*, soit la transmission de la lumière avec le diluant.

S'il y a plusieurs échantillons à analyser par la technique de correction photométique, on peut tous les traiter à la suite avant la deuxième mesure prise sur le diluant à l'étape *g)*. À cette étape, une fois que l'échantillon est enlevé de la chambre extérieure, on prend une mesure comme précédemment, et ainsi de suite pour tous les échantillons. Enfin, on termine l'étape *g)* en prenant la mesure avec le diluant dans la chambre extérieure. Les estimations graphiques prévues à l'étape *h)* se fondent sur une série de lignes verticales tracées d'après les mesures finales de la bioluminescence des échantillons (en haut à droite), en vue de déterminer une série d'interpolations avec le diluant (*Ip*) devant servir à corriger les mesures obtenues pour les échantillons respectifs.

La correction de la CI50 se fait au moyen de constantes dérivées des proportions géométriques de la cuvette de correction photométrique. *SDI* recommande d'employer une calculatrice ou un

ordinateur pour faire les calculs (*cf.* 4.5.2). Les formules de calcul manuel suivantes se retrouvent dans BNQ (1987) et Microbics (1988a), sous une forme légèrement différente.

Calculer comme suit l'absorbance résultant de la correction photométrique (A_C) :

$$A_C = 3{,}1 \ln (I_p / I_f)$$

Pour toute concentration soumise à l'essai (C_x), calculer comme suit l'absorbance due à l'échantillon (A_x) :

$$A_x = A_C (C_x / C)$$

Convertir cette absorbance en la transmittance prévue à la concentration soumise à l'essai (T_x), au moyen de la formule suivante :

$$Tx = (1- e^{-Ax}) / A_x$$

Calculer une valeur corrigé de γ (γ_c), à partir de la valeur de γ calculée pour la concentration à l'essai (γ_x), comme suit :

$$\gamma_c = T_x (1 + \gamma_x) - 1$$

où :

A_C = absorbance résultant de la correction photométrique à la concentration C

A_x = absorbance à la concentration C_x

C = concentration de l'échantillon utilisé pour l'essai de correction photométrique

C_x = toute concentration (précisée) soumise à l'essai

e = base des logarithmes naturels

I_0 = bioluminescence au temps zéro

I_5 = bioluminescence après 5 min

I_f = bioluminescence de l'échantillon utilisé pour l'essai de correction photométrique (obtenue sur l'enregistrement graphique)

I_p = bioluminescence du diluant utilisé pour l'essai de correction photométrique (obtenue par interpolation à partir de l'enregistrement graphique)

T_x = transmittance calculée à la concentration C_x

γ_x = valeur γ calculée initialement à la concentration C_x

γ_c = valeur corrigée de γ

On se sert ensuite des valeurs corrigées de γ aux concentrations soumises à l'essai pour calculer une CI50 corrigée. À cette fin, on suppose que l'interférence de la couleur correspond à une relation linéaire à toutes les concentrations, ce qui pourrait parfois ne pas être vrai. On pourrait mesurer l'absorbance à chaque concentration, mais cette lecture est rarement justifiée; on pourrait tout au plus faire une nouvelle vérification à une concentration élevée de l'échantillon, comme on le mentionne dans Beckman (1982).

Méthodes applicables à l'analyseur de modèle 500

Toutes les méthodes de la section 4 s'appliquent à l'analyseur Microtox de modèle 2055 qui était, jusqu'à tout récemment, le plus couramment employé dans les laboratoires canadiens. Beaucoup des méthodes générales et des principes décrits à la section 4 s'appliquent également au nouvel analyseur de modèle 500 (1989), mais il existe quelques différences. Elles sont expliquées ci-après et illustrées au tableau 2 et à la figure 4.

5.1 Principales différences

Les principales différences entre les analyseurs de modèles 2055 et 500 (*cf.* tableau 2) sont les suivantes :

a) Dans l'analyseur de modèle 500, la plupart des fonctions sont automatisées, y compris la descente d'une cuvette donnée dans la position de mesure de la bioluminescence, sur simple pression d'un bouton. Cette caractéristique permet d'uniformiser plus facilement la synchronisation et le rythme des mesures. Toutefois, le nouveau modèle peut être commandé manuellement, si on le désire, pour toutes les étapes utilisées avec le modèle 2055.

b) Le modèle 500 peut contenir 30 cuvettes au lieu de 15. On peut ainsi analyser trois échantillons simultanément, si on le désire.

Tableau 2 Comparaison des analyseurs Microtox des modèles 2055 et 500

Caractéristique	Nº de modèle	
	2055	500
Nombre de puits d'incubation	15	30
Réglage de l'étendue *(SPAN)*	Manuel	Automatique
Réglage de la température	Manuel	Automatique
Réglage du zéro	Manuel	Automatique
Vérification de la haute tension *(HV)*	Manuelle	Automatique
Vérification de l'étalonnage *(CAL)*	Manuelle	Automatique
Déplacement des cuvettes	Manuel	Non nécessaire
Point d'accès à un ordinateur	Facultatif	Présent
Point d'accès à un enregistreur	Présent	Présent
Vérification de la tourelle	Manuelle	Automatique
Vérification des puits d'incubation	Manuelle	Automatique
Vérification de l'air	Manuelle	Automatique
Réglage de la sensibilité	Manuel	Automatique

c) Le nouvel analyseur est conçu de façon à tramettre les données à un ordinateur ou à un enregistreur graphique. Le logiciel offert par *SDI* peut s'adapter facilement et comporte de nombreuses options permettant d'analyser différentes séries de concentrations, de faire des essais en double, de saisir les données manuellement ou automatiquement, etc. On peut également utiliser ce logiciel sur l'analyseur de modèle 2055, si celui-ci est doté d'une interface avec un ordinateur.

Le modèle 500 est semblable au modèle 2055 (*cf.* figure 2), mais il possède des puits pour 30 cuvettes, il n'a pas de tourelle proéminente et il ne comprend pas de boutons de réglage. Les données de l'essai seraient vraisemblablerment transmises à un ordinateur plutôt qu'à un enregistreur graphique.

5.2 Modifications particulières des méthodes

Dans un guide publié récemment (Microbics, 1992) *AZUR* donne une description détaillée de la marche à suivre. En général, les liquides utilisés et leurs quantités, ainsi que le déroulement des opérations, restent tels que dans les sections précédentes. Certaines étapes de la méthode manuelle ne sont plus nécessaires; on les mentionne ci-dessous, par renvoi aux sections antérieures correspondantes du présent document. Certaines observations et recommandations de portée général accompagnent la description des modifications.

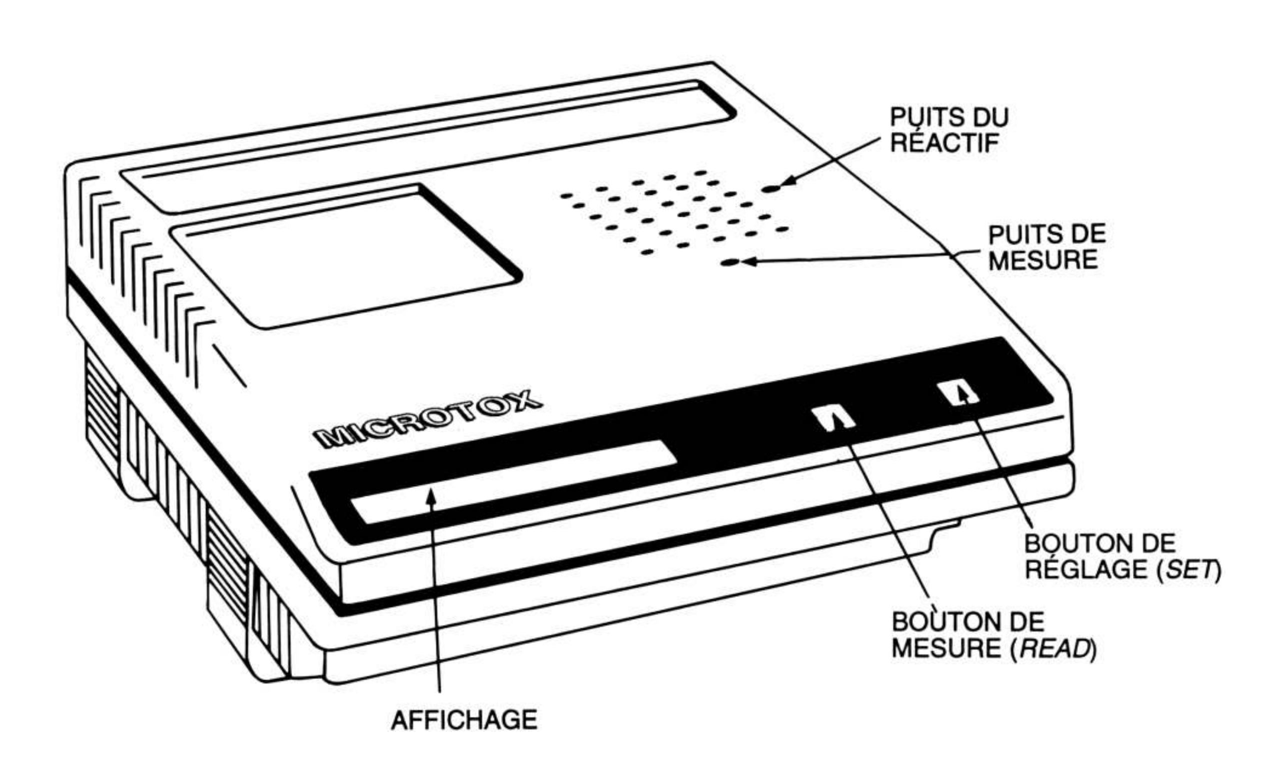


Figure 4 Aspect de l'analyseur de modèle 500 utilisé pour l'essai Microtox

3.2.2 *d)* Il est probable que l'enregistreur graphique ne sera pas l'option retenue par les analystes, étant donné qu'il est considéré comme étant quelque peu dépassé pour le nouvel analyseur. Le modèle 500 transmet les mesures à un micro-ordinateur (*cf.* 3.2.2 *e)*) aux fins d'enregistrement et de traitement ultérieur. On peut également relever les valeurs photométriques d'un affichage placé à l'avant de l'analyseur et les consigner à la main. Le modèle 500 ajuste les mesures à des valeurs relatives comprises entre 0 et 199. Au cours de la normalisation initiale, on assigne la valeur 0 à une mesure sans lumière, et une valeur proche de 95 à la mesure du blanc de réactif.

4.2.1 *a)* à *e)* L'analyseur vérifie automatiquement les températures et, s'il se produit des écarts par rapport à la température désirée, un voyant lumineux le signale à l'analyste. L'appareil effectue les étapes d'étalonnage lorsque l'on presse le bouton *SET* (réglage).

4.2.2 La version 6.0 du programme informatique de SDI permet l'emploi de différentes séries de concentrations, tandis que les versions antérieures de ce logiciel nécessitaient des dilutions de moitié. Les utilisateurs de ces versions feraient bien de se procurer le nouveau logiciel.

4.3.2 *b)* Il es peu probable que les temps de mesure soient indiqués sur un enregistrement graphique. Si les données sont transmises directement à un ordinateur, le programme signale le moment approprié pour effectuer les mesures. Sinon, on doit se servir d'un chronomètre.

4.5 *a)* et *b)* Les calculs du rapport du témoin et de la valeur de γ seront très probablement faits par un programme informatique (*cf.* 4.5.2). L'analyste devrait obtenir un tracé produit par l'ordinateur et vérifier tous les calculs et toutes les données pour détecter des valeurs invraisemblables. On devrait examiner toute anomalie apparente, jusqu'à refaire les calculs ou le tracé manuellement. En particulier, si la CIp est supérieure à la concentration la plus élevée soumise à l'essai, elle n'est pas considérée comme étant valide aux fins d'Environnement Canada. Elle peut cependant être qualifiée de « provisoire », d'« extrapolée » ou d'un autre adjectif du genre et servir à des fins de comparaison générale (*cf.* 4.8.5).

4.9 Dans le cas de la technique de correction photométrique, la méthode, les manipulations et les mesures sont semblables, dans l'ensemble, à celles que l'on utilise avec le modèle 2055, à l'exception de certains détails. Aucune analyse graphique n'est effectuée à partir de mesures sur un enregistrement graphique, mais on calcule arithmétiquement une valeur corrigée de I_0, que l'on utilise dans le programme pour évaluer la CI50 ou la CIp.

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5.

6.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche technique sur la sécurité d'utilisation de ce produit, s'il en existe une. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés, les quantités d'additifs et le coefficient de partage *n*-octanol/eau[28]. Il faudrait en outre disposer d'une méthode admissible de dosage du produit en solution aqueuse dans l'intervalle prévu des concentrations d'essai, ainsi que de données relatives à la précision et à l'exactitude des dosages. Lorsque la solubilité dans l'eau du produit chimique est douteuse, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être consignées.

Les contenants devraient être fermés hermétiquement et, dès réception, codés ou étiquetés (nom du produit, founrisseur, date de réception, responsable des essais, etc.). Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques doivent être respectés.

6.2 Préparation des solutions d'essai

S'il fallait analyser un nouveau pesticide ou un nouveau produit chimique d'une catégorie semblable dans le cadre d'un programme officiel de réglementation et d'homologation, les règlements applicables pourraient exiger l'emploi de répétitions des concentrations d'essai.

L'« échantillon » à analyser est une solution mère ou une dilution de celle-ci, préparée en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau désionisée. On devrait mesurer la concentration du produit chimique dans la solution (*cf.* 6.3) et déterminer sa stabilité avant de commencer l'essai. Les solutions mères sujettes à la photolyse devraient être gardées à l'obscurité, et les solutions instables doivent être préparées peu avant l'emploi. La salinité de l'échantillon devrait être ajustée à 2 % (*cf.* 4.2.2 *c)*) au début de l'essai. L'échantillon devrait satisfaire aux exigences en matière de couleur, de turbidité, de pH et de teneur en oxygène dissous précisées dans la sous-section 4.1. L'essai Microtox peut ensuite être effectué suivant la méthode universelle décrite à la section 4.

Dans le cas de produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. Cette dernière technique peut produire des gouttelettes

[28] La connaisance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions particulières requises pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans une installation bien ventilée). L'information concernant la solubilité et la stabilité du produit chimique est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

non uniformes et de tailles différentes, dont certaines pourraient migrer vers la surface du liquide, ou encore des gouttelettes n'ayant pas toutes la même biodisponibilité, ce qui pourrait créer des variations de la toxicité. Elle pourrait également avoir des effets sur la transmission de la lumière, qui constitue un facteur primordial dans l'essai Microtox. On ne devrait pas utiliser de solvants, d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être incorporées avec ce produit dans des formulations commerciales d'usage normal. Le cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la plus forte concentration d'agent solubilisant qu'on retrouve dans les solutions d'essai. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement : leur concentration ne devrait pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai. Lorsqu'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants : diméthylformamide, diméthylsulfoxyde[29], triéthylèneglycol, méthanol, éthanol et acétone (EPA, 1985).

6.3 *Observations et mesures sur les échantillons*

Pendant la préparation de la solution mère, on devrait l'examiner afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., odeur, couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable de mesurer la concentration du produit chimique dans la solution mère[30]. Des aliquotes devraient être préservées, stockées (si nécessaire) et analysées au moyen des meilleures méthodes éprouvées de la concentration du produit chimique, on devrait l'utiliser pour calculer et exprimer la toxicité, à moins que l'on ait de bonnes raisons de penser que cette mesure n'est pas exacte.

---

[29] Conserver le diméthylsulfoxyde sous sa forme liquide à 19° C ou plus. S'il était congelé et dégelé à plusieurs reprises, sa toxicité pourrait s'accroître.

[30] Il n'est pas nécessaire de faire une analyse de ce genre dans tous les cas, en raison des coûts à engager, des limites de l'analyse ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant que le produit chimique est stable en solution dans des conditions semblables à celles qui prévalent pendant la préparation de la solution et l'exécution de l'essai. L'analyse est particulièrement recommandable si la substance à expérimenter est volatile ou peu soluble, ou encore si elle précipite ou est adsorbée par le contenant.

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai d'échantillons, d'effluents, de lixiviats et d'élutriats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5. À noter que certains essais sur des sédiments peuvent exiger une analyse séparée de l'eau de porosité, selon la marche à suivre indiquée pour les élutriats.

7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques. Pour les échantillons de grand volume devant subir des essais sur des organismes plus gros en plus de l'essai Microtox, on accordera la préférence à des contenants en verre ou revêtus de Teflon^MC, qui sont inertes et n'adsorbent guère de produits chimiques. Les contenants de polyéthylène ou de polypropylène qui servent au transport d'eau potable sont moins intéressants, mais ils peuvent aussi être utilisés. Pour les échantillons plus petits destinés à subir uniquement l'essai Microtox, on recommande d'employer des contenants de verre borosilicaté munis d'un bouchon à vis revêtu de Teflon ou d'un autre type de fermeture reconnu comme non toxique.

Il est recommandé de prélever des échantillons de 500 mL à 1 L pour l'essai Microtox, de sorte qu'on puisse en utiliser des parties pour la mesure du pH initial, de l'oxygène dissous et d'autre propriétés (cf. 4.1.2, 4.1.3 et 7.4). Les contenants doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée; ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir de manière à réduire les vides d'air.

Au moment du prélèvement, chaque contenant doit être fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. Les renseignements qui doivent figurer sur l'étiquette comprennent au moins le type et la source de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom du ou des préposés à l'échantillonnage. Les échantillons reçus par le laboratoire dans des contenant non étiquetés ou non codés ne devraient pas être retenus pour les essais. Il en est de même pour ceux reçus dans des contenants partiellement remplis, car les substances toxiques volatiles peuvent alors s'échapper dans le vide d'air. Par ailleurs, lorsqu'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces échantillons pourraient faire l'objet d'essai, à la discretion de l'analyste.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Chaque fois que possible, on devrait commencer les essais moins de 24 h après le prélèvement des échantillons, et on doit le faire moins de 72 h après ce moment. Les échantillons de sédiments ou de sols prélevés pour extraction et essai de l'élutriat devraient aussi faire l'objet d'un essai le plus tôt possible; il est recommandé de commencer les opérations d'extraction dans les deux semaines (de préférence, dans la semaine) suivant l'échantillonnage, et l'essai doit commencer au plus tard six semaines après l'échantillonnage (Environnement Canada, 1994). On devrait suivre les méthodes établies par Environnement Canada (1994) pour la préparation des élutriats. L'essai des élutriats doit commencer moins de 72 h après leur préparation ou dans les délais indiqués dans le règlement ou le protocole expérimental pertinent.

Tous les échantillons d'effluents ou de lixiviats devraient être gardés au frais pendant le transport

(de 1 à 7° C, de préférence à 4 ± 2° C). Au moment du prélèvement, les échantillons chauds (plus de 7° C) devraient être ramenés entre 1 et 7° C avec de la glace ou des sacs réfrigérants. Au besoin, il faudrait utiliser de ces sacs ou d'autre moyens de réfrigération pour s'assurer que la température des échantillons demeure entre 1 et 7° C durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport. Ils devraient être stockés à l'obscurité, dans des contenants fermés hermétiquement, à 4 ± 2° C. Les sous-échantillons à analyser devraient être ramenés à 15° C immédiatement avant l'essai.

Sauf indication contraire, la température pendant le transport et le stockage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat devraient être conformes aux indications ci-dessus.

7.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés, afin d'assurer la remise en suspension des solides décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d., les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble, afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de poursuivre le stockage, l'échantillon composite (ou un partie de cet échantillon) doit être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (*cf.* 7.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Le pH et la teneur en oxygène dissous de l'échantillon devraient être vérifiés par rapport aux limites précisées aux sections 4.1.2 et 4.1.3.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une portion non diluée de l'échantillon (*cf.* 4.8.3) et sur une solution de contrôle. Les règlements peuvent exiger que l'on prévoie des répétitions de la solution de contrôle, de toutes les concentrations d'essai ou de certaines d'entre elles. Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., pour déterminer les sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, l'efficacité d'un traitement ou les effets de la modification de procédés sur la toxicité) peuvent, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence de toxicité ou de faire une évaluation préliminaire d'un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative.

7.3 Eau de dilution

Pour les rejets d'effluents en eau douce ainsi que les lixiviats et élutriats contenant de l'eau douce, le diluant décrit dans la méthode universelle devrait habituellement être utilisé pour les essais. Normalement, il ne convient pas d'employer comme eau de dilution de l'eau de surface provenant de lacs, de rivières et de ruisseaux en vue de simuler les conditions locales[31].

Il existe d'autres options pour les effluents rejetés en mer et pour les élutriats obtenus en utilisant de l'eau de mer, comme pour l'évaluation de sédiments marins. Le choix de l'option à retenir dépend de l'objectif de l'essai. Si l'on souhaite obtenir un taux de toxicité « normalisé », on devrait suivre la méthode universelle en se servant du diluant Microtox ordinaire et de la salinité habituelle de 2 %. Si l'on veut simuler les conditions locales, la salinité de l'échantillon et celle du diluant devraient correspondre à celle

---

[31] L'essai Microtox ne simule pas les conditions précises prévalant localement dans les plans d'eau douce, car il est exécuté à une salinité fixe de 2 %. Par conséquent, les estimations de la toxicité sont « normalisées » pour des produits chimiques, des eaux usées, des sédiments ou des substances solides en particulier.

Les polluants qui sont déjà présents dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou des eaux usées qui font l'objet de l'analyse. Lorsque c'est le cas, le diluant ordinaire non contaminé donnerait une estimation précise de la toxicité d'effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat, mais pas nécessairement de son effet global dans la zone à l'étude.

du milieu récepteur. La bactérie *Vibrio fischeri* servant aux essais présente une bioluminescence maximale dans l'intervalle de salinité de 2 à 3,7 %.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau de mer non contaminée, plutôt que du diluant Microtox, si l'échantillon lui-même est composé essentiellement d'eau de mer, par exemple un élutriat d'eau de mer ou encore un lixiviat ou un effluent d'eau salée. En effet la bactérie produit généralement beaucoup plus de lumière dans de l'eau de mer naturelle que dans le diluant, qui ne contient que du chlorure de sodium, même lorsque sa salinité est augmentée jusqu'au niveau de celle de l'eau de mer.

Il serait beaucoup moins indiqué d'utiliser le dilant Microtox pour l'essai d'un échantillon constitué essentiellement ou en grande partie d'eau de mer. En effet, comme la bioluminesence serait plus élevée dans l'eau de mer que dans une solution de NACl, il y aurait un déséquilibre dans l'essai en ce qui concerne la bioluminescence « de fond » dans les diveres dilutions de l'échantillon. On ne résoudrait pas ce problème en augmentant la salinité du diluant (2 %), à l'aide de la solution *MOAS* ou de chlorure de sodium, jusqu'à niveau normal pour de l'eau de mer, pas exemple 3,5 %, ou jusqu'à la salinité de l'échantillon. On devrait ajuster la salinité de cette façon si l'on choisissait cette option pour quelque raison que ce soit, mais il serait préférable d'opter pour l'autre option décrite dans le paragraphe précédent, soit de remplacer le diluant Mictotox par de l'eau de mer.

Si l'effluent, le lixiviat ou l'élutriat était à base d'eau salée, mais d'une salinité inférieure à celle de l'eau de mer, l'essai Microtox ne devrait pas être exécuté à moins de 2 % de salinité (sauf si l'on voulait déterminer un ordre de grandeur très approximatif). La bioluminescence diminue considérablement lorsque la salinité est réduite à moins de 2 % (Krebs, 1983). Cependant, on pourrait augmenter la salinité de toutes les solutions d'essai jusqu'à plus de 2 %, mais en deçà de la salinité de l'eau de mer elle-même, préférablement au moyen de quantités appropriées d'eau de mer non contaminée. Le principe directeur dans tout essai de ce genre est que la salinité de l'eau de mer « naturelle » devrait être constante dans toutes les cuvettes.

7.4 Observations et mesures sur les échantillons

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à.-d., la présence de matières flottantes ou de solides décantables) des échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. On devrait analyser les échantillons qui contiennent une quantité importante de solides pour déterminer leur teneur totale en particules en suspension (APHA *et al.,* 1989). La précipitation, la floculation, le changement de couleur, l'odeur ou les autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés.

Si l'on craint qu'il y ait interférence dans la transmission de la lumière à cause d'une couleur vive ou de la présence d'une quantité importante de solides ou de matières flottantes ou émulsifiées, il faudrait procéder à une correction photométrique suivant la technique décrite à la section 4.1.1 et à la sous-section 4.9.

7.5 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité aux exigences réglementaires pourraient porter sur une seule concentration et une solution de contrôle (*cf.* 7.2). Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude, mais il pourrait s'agir, notamment, de cotes arbitraires de réussite ou d'échec fondées sur un pourcentage de réduction de la bioluminescence à une concentration donnée. Pour les essais à concentrations multiples, les résultats seraient la CI50 comme le prévoit la sous-section 4.5.

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillon de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5.

8.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 7.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons, de préférence moins de 24 h et pas plus de 72 h après l'échantillonnage.

8.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la sous-section 7.2. Lorsque les échantillons contiennent beaucoup de matières en suspension, on devrait prendre les précautions décrites à la section 4.1.1. Le pH et la teneur en oxygène dissous de l'échantillon devraient être vérifiés par rapport aux limites précisées dans les sections 4.1.2 et 4.1.3.

8.3 Eau de dilution

Lorsqu'ils s'agit d'eau douce de surface, on devrait utiliser la méthode de base (universelle). Pour les échantillons d'eau marine ou estuarienne de surface, d'autres méthodes sont possibles.

Si l'échantillon de milieu récepteur est lui-même composé d'eau de mer, on n'ajoute pas de solution *MOAS* à l'échantillon. En pareil cas, on recommande d'utiliser de l'eau de mer « naturelle » non contaminée comme diluant, c'est-à-dire comme eau de contrôle et de dilution de échantillons. Le principe et la méthode sont décrits plus en détail à la sous-section 7.3.

Si le milieu récepteur est estuarien, on doit mesurer sa salinité et l'ajuster à la hausse, s'il y a lieu, afin d'obtenir une salinité d'au moins 2 %, nécessaire à l'exécution de l'essai. Pour ce faire, on peut utiliser de la solution *MOAS* ou des cristaux de chlorure de sodium (NaCl), si on le veut; cependant, il serait très souhaitable que le diluant contienne de l'eau de mer non contaminée dont la salinité serait corrigée pour correspondre à celle de l'échantillon. Si l'échantillon de milieu récepteur a une salinité supérieure à 2 % mais inférieure à celle de l'eau de mer, il serait préférable d'utiliser comme diluant de l'eau de mer non contaminée, diluée pour obtenir une salinité égale à celle de l'échantillon. Encore une fois, le principe directeur de toute manipulation de ce genre est que chaque cuvette soumise à l'essai devrait contenir la même quantité d'eau de mer et la même quantité de NaCl, s'il y a lieu.

8.4 Observations et mesures sur les échantillons

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques des échantillons devraient être observés conformément aux dispositions de la sous-section 7.4, pendant la préparation des solutions d'essai.

8.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être

conformes aux options et aux démarches prévues dans les sous-sections 4.5 et 7.5.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une portion non diluée de l'échantillon (cf. 4.8.3) et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Lorsqu'il est probable que les échantillons de milieu récepteur soient toxiques, comme dans le cas de zones de mélange, et que l'on désire obtenir des renseignements sur la dilution additionnelle ou sur les améliorations nécessaires pour obtenir des conditions satisfaisantes, on devrait effectuer un essai pour déterminer la CI50 conformément à la méthode de base de la section 4. Souvent, les échantillons d'eaux de surface ne seront pas suffisamment toxiques pour produire une CI50. On peut alors utiliser le système Microtox pour catégoriser les eaux de surface en fonction de la perte de bioluminescence causée par un échantillon dilué à 45 %, soit à la concentration la plus élevée que l'on peut utiliser dans la méthode de base (Kaiser *et al.*, 1988a, 1988b).

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de sédiments et de solides assimilés

On trouvera dans la présente section des instructions générales pour l'essai de liquides provenant d'échantillons de sédiments ou de solides assimilés, comme les sols, ainsi que pour l'essai Microtox « en phase solide ». Ces instructions viennent s'ajouter aux directives générales des sections 4 et 5. Dans la présente section, le terme « sédiment » est employé pour des raisons de commodité, mais il inclut des substances solides assimilées comme les sols et les boues provenant d'installations industrielles ou municipales, qui peuvent polluer les eaux de surface ou nécessiter des essais pour d'autres raisons.

9.1 Généralités

On donne ici des renseignements généraux sur l'utilisation de l'essai Microtox pour des essais avec des sédiments et de l'eau extraite de sédiments. Le présent rapport ne vise pas à fournir des instructions pour étudier les sédiments sur le terrain, pour les échantillonner ou pour en extraire des liquides ou des matières. On trouvera dans un document d'orientation d'Environnement Canada (1994) des recommandations détaillées pour le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation des sédiments. Il faudrait suivre ces recommandations lorsqu'on prélève des échantillons de sédiments et qu'on les prépare en vue d'un essai Microtox. D'autres conseils sur ces questions sont fournis dans des livres (Murdoch et Macknight, 1991), des études de synthèse (Giesy et Hoke, 1989; McLeay et Sprague, 1991) et des méthodes normalisées (ASTM, 1991a, 1991b).

L'essai Microtox est généralement considéré comme une méthode rapide et utile pour comparer la toxicité d'extraits de sédiments contaminés (Schiewe *et al.*, 1985). Il est l'un des quatre essais de toxicité dont on a recommandé l'inclusion dans une série d'essais sur des sédiments, à la suite d'un étude de synthèse complète des essais disponibles (Giesy et Hoke, 1989). Une étude de 50 sédiments provenant de la côte de l'État de Washington a indiqué que l'essai Microtox, un essai sur des embryons d'huîtres et un essai sur des amphipodes ont produit des résultats concordants, mais qu'on aurait avantage à utiliser divers essais; l'essai Microtox a décelé la toxicité d'un nombre plus élevé de sédiments que chacun des deux autres essais (Williams *et al.*, 1986; Becker *et al.*, 1990). Une autre étude a montré que l'essai Microtox et un essai de toxicité sur des embryons d'échinodermes étaient les essais les plus sensibles parmi sept essais de sédiments évalués (Pastorok et Becker, 1989). Strosher (1984) a analysé 48 liquides surnageants de boues de forage et a conclu que les essais sur des bactéries luminescentes étaient plus sensibles, plus reproductibles, plus rapides et plus économiques pour évaluer la toxicité que deux essais sur des poissons et un essai sur la germination de graines.

Brouwer *et al.* (1990) ont utilisé l'essai Microtox en phase solide afin d'analyser des sédiments du port de Hamilton (Ontario). Ils ont constaté que cet essai était plus sensible aux substances toxiques hydrophobes, comme les biphényles polychorés (BPC), qu'un autre essai Microtox avec un élutriat liquide. De même façon, l'essai en phase solide s'est révélé plus sensible pour l'essai sur des liquides extraits lors de l'analyse de sédiments provenant du port de Halifax (Tay *et al.*, 1991) et de plusieurs autres zones industrielles du Canada (van der Geest, 1991).

9.1.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les techniques générales utilisées pour l'étiquetage, le transport et le stockage des échantillons de sédiments devraient être conformes aux instructions de la sous-section 7.1. On devrait aussi suivre les recommandations additionnelles fournies par Environnement Canada (1994). Les limites de température sont celles qui sont indiquées à la sous-section 7.1, et il est à souligner que les échantillons ne doivent geler ni complètement, ni partiellement, et ne doivent pas sécher (Environnement Canada, 1994; ASTM, 1991b).

Pour les liquides dérivés de sédiments, il faudrait utiliser les contenants et les méthodes de manipulation décrits à la sous-section 7.1 au sujet des élutriats. Lorsque l'on a utilisé un solvant non aqueux pour extraire des substances, on devrait se servir d'un contenant en verre pour stocker le liquide obtenu, de sorte que ce contenant ne soit pas modifié par le solvant et que le liquide n'absorbe pas de substances par lixiviation.

Les essais devraient débuter le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons. Les essais en phase solide ou les procédés d'extraction devraient commencer moins de deux semaines après l'échantillonnage et, de préférence, moins d'un semaine après le prélèvement des échantillons[32]. Il faut commencer les essais avec les liquides extraits de sédiments moins de 72 h après leur préparation, ou dans le délai précisé dans le règlement ou le protocole pertinent.

9.1.2 Préparation des échantillons

Selon la nature des échantillons et les objectifs de l'essai, il se peut que l'on doive mélanger les échantillons pour les rendre homogènes avant de procéder aux essais. Les cas échéant, on doir s'assurer de bien le faire. Les sous-échantillons (c.-à-d., les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble. Sil est nécessaire de poursuivre le stockage, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) devrait être retourné dans les contenants de sous-échantillons.

9.1.3 Observations et mesures sur les échantillons

Pendant la préparation des solutions d'essai, on devrait effectuer des observations relatives à la couleur, à la turbidité, au moussage, à la précipitation, etc., sur les sédiments et sur tout liquide provenant de ceux-ci, conformément aux directives de la sous-section 7.4.

9.1.4 Sédiments de contrôle ou de référence

Un ou plusieurs échantillons de sédiments de contrôle ou de référence doivent être analysés suivant la même technique que les sédiments à l'étude. Bien que la méthode d'essai prévoie l'utilisation d'un témoin ne contenant pas de substances provenant du sédiment à l'étude, l'expérience montre qu'il se peut que ce témoin ne suffise pas pour effectuer une évaluation acceptable de la toxicité. Les laboratoires d'Environnement Canada et d'autres organismes constatent souvent des effets toxiques apparents dans des sédiments non contaminés au cours d'essai sur une suspension solide-liquide (*cf.* 9.3). Par conséquent, pour chaque essai d'un sédiment ou d'une série de sédiments, il faudrait utiliser un ou plusieurs sédiments de contrôle ou de référence comme échantillons, pour faciliter la détermination d'un niveau « normal » ou de base.

À cette fin, il serait souhaitable de choisir un sédiment de référence normalisé ou une série de sédiments de référence ayant différentes caractéristiques, que l'on pourrait apparier aux sédiments à expérimenter. Il serait également souhaitable de vérifier s'il y a des différences

---

[32] La toxicité et la géochimie des sédiments contaminés provenant du port de Hamilton auraient changé après un stockage de plus d'une semaine; cependant, les données devant étayer cette affirmation n'ont pas été fournies (Brouwer *et al.*, 1990). L'exécution des essais dans les deux semaines suivant l'échantillonnage est conforme aux techniques normalisées actuelles des États-Unis (ASTM, 1991b) et aux récentes lignes directrices d'Environnement Canada (1994) en raison des difficultés d'ordre pratique qui se posent pour des périodes plus courtes, y compris le délai nécessaire s'il faut effectuer des analyses chimiques préliminaires.

significatives dans les résultats obtenus avec les sédiments de référence et les sédiments à expérimenter. L'essai d'un sédiment de contrôle ou de référence, ou d'un liquide extrait d'un tel sédiment, n'est pas nécessairement exigé dans les méthodes de *SDI*, mais il fait partie intégrante de la méthode exposée dans le présent document. Les sédiments de contrôle ou de référence devraient être semblables aux sédiments à l'étude en ce qui a trait à leurs caractéristiques physiques et chimiques générales. En particulier, il faudrait tenter d'obtenir la même répartition granulométrique et le même équilibre entre substances organiques et inorganiques (ASTM, 1991a, 1991b; McLeay et Sprague, 1991; Environnement Canada, 1994).

Il n'y a pas qu'une seule façon d'utiliser les résultats obtenus avec un sédiment de contrôle ou de référence. Si celui-ci ne présente aucune toxicité, les résultats obtenus avec le sédiment à expérimenter sont considérés comme valides, mais s'il révèle une certaine toxicité, il ne semble pas encore y avoir de méthode normalisée pour corriger les résultats obtenus avec le sédiment à expérimenter[33]. Il faudrait donc interpréter avec circonspection les résultats obtenus avec celui-ci. On pourrait effectuer des tests de signification statistique, avec l'aide d'un statisticien, si l'on dispose d'observations en double ou d'essais répétés.

9.2 Essai de liquides extraits de sédiments ou de solides assimilés

Les substances toxiques provenant des sédiments ou des sols peuvent passer à la phase aqueuse et avoir des effets sur les organismes présents dans les eaux de surface; l'essai Microtox peut s'avérer utile pour analyser ces effets. La phase aqueuse pourrait consister en un liquide provenant d'un sol ou d'un sédiment (p. ex., de l'eau interstitielle), ou en un liquide utilisé pour traiter l'échantillon et en extraire d'éventuelles substances toxiques (p. ex., un élutriat). Afin d'obtenir ces liquide, on devrait suivre les méthodes recommandées par Environnement Canada (1994) pour l'extraction de l'eau de porosité ou pour la préparation d'un élutriat.

Il existe quatre grandes catégories de liquides extraits d'un sédiment en vue d'un essai de toxicité :

1) De l'eau de porosité, c'est-à-dire de l'eau qui remplit les espaces entre les particules et qui pourrait se mêler à l'eau sous-jacente formant le lac, la rivière, l'estuaire, etc. En général, on l'extrait du sédiment par centrifugation ou compression (*cf.* 9.3.2).

2) De l'eau non contaminée utilisée pour obtenir un extrait aqueux des substances contenues dans le sédiment (c.-à-d., un élutriat), par exemple, en l'agitant avec un échantillon.

3) Du diluant Microtox ou de l'eau pure dont la salinité a été ajustée et qui a servi à obtenir un extrait aqueux de la manière décrite au point 2) ci-dessus.

4) Un solvant autre que de l'eau (p. ex., un solvant organique) utilisé pour extraire des substances de l'échantillon de sédiment (Schiewe et al., 1985; True et Heyward, 1990).

On peut analyser les liquides appartenant aux trois premières catégories de la même façon que l'on analyse un échantillon liquide ordinaire, en suivant la méthode de base décrite à la section 4. Il faudrait prêter une attention particulière à toute difficulté créée par la couleur ou la turbidité (cf. 4.1.1 et 4.9).

---

[33] Brouwer *et al.* (1990) ont effectué une correction de ce genre en expriment la bioluminescence du sédiment à expérimenter en tant que pourcentage de celle du sédiment de contrôle ou de référence. Cependant, une seule concentration de chaque sédiment a été mise à l'essai, et cette technique ne semble pas avoir été utilisée pour un essai à concentrations multiples.

Quant à la quatrième catégoire, à savoir les solvants, on recommande que chacune des cuvettes ait la même teneur en solvant. La teneur en solvant du diluant dont on se servira pour l'essai doit correspondre à la concentration la plus élevée présente dans les liquides à expérimenter. L'effet du solvant, s'il en produit un, devrait alors être le même dans toutes les cuvettes. Une autre méthode consiste à inclure un contrôle renfermant la plus forte concentration de solvant représentée dans l'essai, ainsi qu'un contrôle sans solvant. Il serait souhaitable d'effectuer un essai distinct afin de déterminer la CI50 du solvant. Une marche à suivre particulière pour l'essai de solvants organiques figure dans un manuscript de Microbics (1990), et elle pourrait être intégrée à des guides futurs.

9.2.1 Préparation des solutions d'essai

La composition de « sous-échantillons » de liquides extraits de sédiments (p. ex., des extraits successifs) devrait s'effectuer conformément aux directives de la sous-section 7.2 et aux recommandations d'Environnement Canada (1994). Les sous-échantillons ne devraient pas être composés si l'on voulait déterminer la toxicité relative des extraits successifs. Pour les échantillons présentant une couleur ou une turbidité appréciable, il faudrait suivre la méthode et prendre les précautions prévues à la section 4.1.1 et à la sous-section 4.9. On devrait vérifier le pH et la teneur en oxygène dissous des échantillons par rapport aux limites prévues dans les sections 4.1.2 et 4.1.3.

Une fois le liquide obtenu, on prépare les concentrations d'essai de la manière habituelle (*cf.* 4.2.2). Comme dans le cas des essais d'effluents, de lixiviats et d'élutriats, on pourrait utiliser une seule concentration (et une solution de contrôle) pour établir si les règlements sont respectés, ou des concentrations multiples pour déterminer la CI50 (*cf.* 7.2). On devrait employer les mêmes méthodes d'extration du liquide et d'analyse pour le sédiment de référence que pour le sédiment à expérimenter.

9.2.2 Eau de dilution

En ce qui concerne les échantillons d'eau douce extraite de sédiments, on devrait suivre la méthode de base (universelle).

Pour les échantillons de sédiments marins ou estuariens, ou d'eau salée extraite de ceux-ci, on pourrait utiliser d'autre méthodes. Si l'extrait est essentiellement composé d'eau de mer, on n'ajouterait pas de solution *MOAS* avant de l'analyser. Il serait préférable d'utiliser de l'eau de mer non contaminée comme eau de contrôle et de dilution des échantillons. On pourrait également ajuster la salinité du diluant Microtox, au moyen de solution *MOAS*, pour qu'elle corresponde à la salinité de l'échantillon, mais il est moins souhaitable de procéder ainsi.

Si l'eau extraite des sédiments présente une salinité inférieure à celle de l'eau de mer d'une eau estuarienne, on devrait mesurer sa salinité et l'ajuster à la hausse, au besoin, pour qu'elle atteigne au moins 2 %. Si l'échantillon d'eau a une salinité supérieure à 2 % mais inférieure à celle de l'eau de mer non diluée, la salinité du diluant devrait être augmentée pour correspondre à la même valeur. On devrait suivre pour ces manipulations les méthodes décrites à la sous-section 8.3.

9.2.3 Résultats et calculs

Les résultats des essais de liquides dérivés de sédiments devraient être conformes aux options et aux méthodes décrites aux sous-sections 4.5 et 7.5.

9.3 Essai d'une suspension solide-liquide

Une modification particulière de la méthode Microtox, appelée « essai en phase solide », est offerte par *SDI* et peut s'appliquer aux sédiments, aux boues, aux sols et aux substances semblables. Étant donné que cette méthode prévoit un contact direct des bactéries avec les matières solides de l'échantillon, on dit qu'elle permet de déterminer la présence de substances

toxiques à l'intérieur et à la surface des particules. En fait, on ajoute un liquide au sédiment et les organismes sont mis en présence d'une suspension; cet essai peut donc se comparer en partie à celui d'un extrait aqueux de l'échantillon.

Une version préliminaire de cette méthode a paru au début de 1991 (Microbics, 1991b). On peut s'attendre à ce que certains détails soient modifiés à mesure que l'on acquiert de l'expérience dans l'exécution des essais; par conséquent, seule la technique générale est présentée ici, et on recommande aux analystes de se procurer les méthodes détaillées exposant les instructions les plus récentes de *SDI*.

En résumé, l'essai consiste à mettre en contact les bactéries luminescenctes avec des suspensions aqueuses salines du sédiment à diverses concentrations, pendant 20 min. Les matières solides sont retirées par filtrage et l'on garde le liquide pendant 5 min additionnelles. On mesure alors la luminescnece du liquide, et l'on estime la CI50.

9.3.1 Appareillage

L'essai est conçu pour être effectué au moyen de l'analyseur de modèle 500, avec traitement informatique des données; on suit donc les méthodes générales de la section 5. Cependant, on peut églement effectuer l'essai au moyen de l'analyseur moins récent de modèle 2055.

En plus des pipettes et des cuvettes à fond plat habituelles, des fournitures spéciales sont nécessaires :

- Diluant pous l'essai en phase solide *(Solid-Phase Diluent)*;
- Tubes pour l'essai en phase solide *(Solid-Phase Tubes)*;
- Colonnes filtrantes pour l'essai en phase solide *(Solid-Phase Filter Columns)*.

9.3.2 Préparation de la substance à expérimenter

Après mélange, l'échantillon de sédiment est centrifugé ou comprimé pour enlever l'eau libre (interstituelle)[34] (ASTM, 1991b; Environnement Canada, 1993). On mélange à nouveau les solides avant l'utilisation.

Mettre dans un support dix tubes pou l'essai en phase solide marqués de A1 à A5 et de B1 à B5. Dans le tube B5, placer 400 mg du sédiment préparé par extraction de l'eau.

9.3.3 Mise en route de l'essai

La technique est décrite en détail par Microbics (1991a) pour un essai simple utilisant une série de neuf concentrations et un contrôle; on en fait ici une description sommaire. Des méthodes où l'on utilise plusieurs contrôles, des concentrations en double, etc, sont décrites dans un autre document de Microbics (1991b).

a) Introduire 1,0 mL de solution de reconstitution dans une cuvette dans les puits du réactif.

b) Placer des cuvettes dans les puits A1 à A5, et B1 à B5.

c) Reconstituer une fiole de bactéries de la façon habituelle (*cf.* 4.3.1 a)), en utilisant la solution de reconstitution du puit du réactif, puis retourner le réactif reconstitué dans ce puit.

d) Verser le réactif reconstitué dans une bouteille de diluant pour l'essai en phase solide, et bien mélanger.

---

[34] On pourrait analyser cette eau en suivant les directives de la sous-section 9.2. Certains laboratoires canadiens qui ont utilisé l'essai Microtox en phase solide indiquent qu'il décèle une toxicité plus grande que ne le fait l'essai Microtox sur de l'eau de porosité extraite par centrifugation (Tay *et al.*, 1991; van der Geest, 1991).

e) Ajouter 2,0 mL du mélange obtenu à l'étape *d)* à chacun des tubes pour l'essai en phase solide placés sur le support (*cf.* 9.3.2), à l'exception du tube contenant le sédiment.

f) Régler un chronomètre à 20 min et ajouter 4,0 mL du mélange contenant les bactéries obtenu à l'étape *d)* au tube pour l'essai en phase solide B5, qui contient l'échantillon; bien mélanger en agitant et en utilisant une pipette.

g) Transférer 2,0 mL du tube B5 au tube B4, puis 2,0 mL de B4 à B3 et ainsi de suite à B2, B1, A5, A4, et A2, mais pas à A1. Il faut bien mélanger le contenu de chaque tube avant de procéder au transfert. Jeter 2,0 mL du tube A2, de sorte que chaque tube contienne 2,0 mL. La concentration la plus forte de matières solides est de 10 % dans le tube B5, les concentrations décroissant selon une dilution de moitié pour atteindre 0,039 % dans le tube A2 et zéro dans le tube A1.

h) Lorsque les 20 min sont écoulées, filtrer le contenu de chaque tube, l'un après l'autre, en poussant une colonne filtrante à l'intérieur du tube[35]. Commencer par la concentration zéro (A1) et continuer par ordre croissant de concentration en terminant avec B5. Chaque fois, transférer 0,5 mL du filtrat liquide à la cuvette portant le numéro correspondant.

i) Laisser le liquide reposer encore 5 min. Régler l'analyseur, au moyen du bouton SET, pour le liquide dans la cuvette A1, qui contient le contrôle, et effectuer la mesure de la bioluminescence. Prendre ensuite les mesures pour le liquide dans les autres cuvettes, en allant de la concentration la plus faible (A2) à la plus forte (B5). Noter les mesures ou les faire enregistrer par l'ordinateur.

j) Répéter l'opération avec le ou les échantillons de sédiment de contrôle ou de référence (sédiment « non contaminé »).

9.3.4 Résultats et calculs

On effectue le calcul de la CI50 en utilisant la méthode générale décrite à la sous-section 4.5. Ce calcul est habituellement fait par le programme informatique de *SDI* (version 6.0), et l'on vérifie manuellement s'il y a des erreurs et si les valeurs obtenues sont vraisemblables.

Il faudrait souligner certaines caractéristiques de cet essai. Il n'y a pas de « mesure au temps zéro » (I_0) pour chacune des cuvettes. La mesure du contrôle (témoin) est considérée comme étant à la fois la mesure au temps zéro pour chaque concentration et celle du contrôle. Par conséquent, le « rapport du témoin » (*cf.* 4.5 *a)*) est toujours de 1,0 et n'a pas besoin d'être estimé, si les calculs sont faits manuellement. Certaines versions antérieures du programme informatique de *SDI* ne prévoyaient qu'une dilution de moitié pour les concentrations, et l'on recommande aux analystes d'utiliser la version 6.0 du programme ou une version plus récente.

---

[35] Dans la plupart des cas, on utilisera probablement la méthode normalisée de filtrage de *SDI*. On recommande cette technique, qui permettrait de comparer les résultats de différents laboratoires utilisant une méthode uniforme. Cependant, Brouwer et al. (1990) signalent que, dans un essai en phase solide, la centrifugation a permis de déceler une toxicité au moins dix fois plus élevée que le filtrage, pour tout diamètre de pore compris entre 0,1 et 8 µm.

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les substances et les méthodes utilisées, ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si les conditions et les méthodes utilisées rendent les résultats admissibles pour l'utilisation prévue.

On peut citer les méthodes et conditions qui sont communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et qui sont conformes aux dispositions du présent document; on peut aussi présenter, en annexe, un rapport général définissant le mode opératoire normalisé. Dans les cas où des choix sont possibles, la démarche retenue devrait être pécisée. Le rapport général devrait faire état des renseignements méthodologiques énumérés aux section 10.2 à 10.4. Un rapport particulier énonçant les résultats de l'essai devrait renfermer les renseignements indiqués dans les sections 10.1 et 10.5. Des programmes de surveillance particuliers pourraient exiger la mention de certains éléments d'information dans le procès-verbal de l'essai (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant un ajustement de la salinité). Les autres détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal devraient être versés au dossiers du laboratoire, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

10.1 Substance à expérimenter

a) Type, source et description de l’échantillon (produit chimique, effluent, lixiviat, élutriat, milieu récepteur; sédiment ou autre substance solide assimilée; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

b) Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

c) Détails sur le modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant, et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

d) Identité de la ou des personnes ayant prélevé et/ou fourni l’échantillon.

e) Date et heure du prélèvement de l’échantillon et du début de l'essai définitif.

f) Toute mesure physico-chimique faite sur l'échantillon (p. ex., concentration du produit chimique, couleur, teneur en matières en suspension).

10.2 Organismes soumis à l'essai

a) Numéro de série ou de lot du réactif bactérien.

b) Date de réception et température de conservation.

10.3 Installations et appareillage

a) Nom et adresse du laboratoire.

b) Nom de la ou des personnes ayant effectué l'essai.

c) Numéro de modèle de l'analyseur et description de tout élément d'appareillage non standard.

10.4 Méthode et conditions d'essai

a) Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée [par exemple, conforme au présent document ou aux guides de Microbics (1988a, 1988b, 1989b)].

b) Teneur en oxygène dissous de l'échantillon à expérimenter, avant et après l'aération initiale, s'il y a lieu. Renseignements sur l'aeration des solutions avant l'essai (le cas échéant, indiquer le débit, la durée et le mode d'application).

c) Résultats de toute autre analyse chimique de la solution mère ou des solutions d'essai, et méthodes d'analyse utilisées.

d) Méthode utilisée pour la préparation de la solution mère et des solutions d'essai de produits chimiques.

e) Détails sur tout ajustement de la salinité des échantillons.

f) Détails sur l'échantillonnage et le stockage, si l'on a utilisé de l'eau de mer non contaminée pour diluer les échantillons.

g) Concentrations soumises à l'essai, y compris celles des solutions de contrôle, et nombre de cuvettes pour chaque concentration.

h) Aspect des solutions d'essai et tout changement survenu pendant l'essai.

i) Température observée dans la section d'incubation de l'analyseur de toxicité.

j) pH de l'échantillon et description de tout ajustement du pH.

k) Heure des observations pendant l'essai.

10.5 Résultats de l'essai

a) Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).

b) Code utilisé pour identifier l'enregistrement graphique des donnés, s'il y a lieu.

c) Mesures de la bioluminescence au temps zéro.

d) Pourcentage d'inhibition de la bioluminescence dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à chaque observation.

e) Résultats de l'essai de correction photométrique (perte de transmission de la lumière causée par la couleur et les autres propriétés de l'échantillon).

f) CI50 et limites de confiance à 95 %, avec la méthode de calcul et les valeurs des variables intermédiares importantes.

g) CI50 et limites de confiance à 95 % pour le ou les produits toxiques de référence, déterminés moins d'un mois de l'essai ou au moment d'utiliser pout la première fois un nouveau lot de réactif bactérien, et moyenne géométrique (± 2 fois l'écart-type) des résultats obtenus antérieurement au laboratoire pour le ou les même produits.

References

Abernethy, S.G. et G. F. Westlake, "Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing", [ISBN No. 0-7729-5947-1.] Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, Direction des ressources en eau, 11 p. (1989).

Alberta, "Microtox Interlaboratory Comparison Study (MICS), Standard Assay Procedure", Chemistry Division, Vegreville (Alb.) Alberta Environment Centre (1987).

Alberta, "Microtox Assay Procedure", Alberta Energy Resource Conservation Board, Edmonton, Alberta, avril 1986, 13 p. (1986).

APHA, AWWA, et WPCF [American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation], "Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms", Part 8000, p. 8-1–8-143 In: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed., Washington, DC (1989).

Ankley, G.T., G.S. Peterson, J.R. Amato, et J.J. Jenson, "Evaluation of Sucrose as an Alternative to Sodium Chloride in the Microtox® Assay: Comparison to Fish and Cladoceran Tests with Freshwater Effluents", *Environ. Toxicol. Chem., 9:*1305–1310 (1990).

ASTM [American Society for Testing and Materials], "Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods", 1991 Annual Book of ASTM Standards E1367-90, p. 1052–1075., Philadelphia, PA, ASTM (1991a).

ASTM, "Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicity Testing", 1991 Annual Book of ASTM Standards E1391-90, p. 1105–1119. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (1991b).

Awong, J., G. Bitton, B. Koopman, et J.L. Morel, "Evaluation of ATP Photometer for Toxicity Testing Using Microtox Luminescent Bacterial Reagent", *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43:*118–122 (1989).

Becker, D.S., G.R. Bilyard, et T.C. Ginn. "Comparisons Between Sediment Bioassays and Alterations of Benthic Macroinvertebrate Assemblages at a Marine Superfund site: Commencement Bay Washington", *Environ. Toxicol. Chem., 9:*669–685 (1990).

Beckman, "Microtox™ System Operating Manual", Beckman Instruments, Inc., Carlsbad, CA (1982).

Billington, J. W., G.-L. Huang, F. Szeto, W. Y. Shiu, et D. MacKay, "Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems", *Environ. Toxicol. Chem., 7:*117–124 (1988).

Blaise, C., R. Van Coillie, N. Bermingham, et G. Coulombe, "Comparison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de fabriques de pâtes et papiers", *Revue internationale des sciences de l'eau 3:*9–17 (1987).

BNQ, [Bureau de normalisation du Québec]. "Eaux–Détermination de la toxicité, Méthode avec la bactérie bioluminescente *Photobacterium phosphoreum*", Ministère de l'Industrie et du Commerce, Bureau de Normalisation du Québec, Québec. NQ 36000-205, 24 p. [Also available in English translation.] (1987).

Brouwer, H., T. Murphy, and L. McArdle, “A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*”, *Environ. Toxicol. Chem.*, *9:*1353–1358 (1990).

Bulich, A.A., “Bioluminescence Assay”, p. 57–74, In: *Toxicity testing using microorganisms*, G.Bitton and B.J. Dutka (éd.), Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL (1986).

Bulich, A.A., N.W. Greene, et D.L. Isenberg, “Reliability of the Bacterial Luminescence Assay for Determination of the Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents”, p. 338–347, In: *Aquatic Toxicity and Hazard Assessment: Fourth Conference*, D.R. Branson and K.L. Dickson (éd.). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 737, Philadelphia, PA (1981).

Curtis, C., A. Lima, S.J. Lozano, et G.D. Veith, “Evaluation of a Bacterial Bioluminescence Bioassay as a Method for Predicting Acute Toxicity of Organic Chemicals to Fish”, p. 170–178, In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*, J.G. Pearson, R.B. Foster, and W.E. Bishop (eds.), American Society for Testing and Materials, ASTM STP 766, Philadelphia, PA (1982).

Dearborn, [Dearborn Environmental Consulting Services], “Characterization of PCF Power Station Combustion Wastes using Total Organic Halide Analysis and Toxicity Screening Tests”, Rapport EPS 3/PG/4, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1986).

DIN [Deustche Industrie Norm]. “Entwurf. Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*”, (Leuchtbakterientest-Abwasser) (L34). Test mit gefriergetrokneten Bakterien. [Draft. Détermination de l'effet inhibiteur d'effluents sur la bioluminescence de la bactérie *Photobacterium phosphoreum*, (Essai avec des bactéries luminescentes sur des eaux usées) (L34). Essai avec des bactéries lypophilisées]. Institute for Norms, Beuth Verlag Gmb H, postbox 1107, 1000 Berlin, DIN38 412 Teil 34, 15 p. (1989).

Dutka, B., “Microtox™ Bioluminescence Bioassay Technique”, Environnement Canada, Institut national de recherche sur les eaux. Burlington, Ontario, Manuscript, 11 p. (1988).

Environnement Canada, “Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel”, Rapport SPE 1/RM/9, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 51 p. (1990a).

Environnement Canada, “Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)*”, Rapport SPE 1/RM/10, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 45 p. (1990b).

Environnement Canada, “Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.”, Rapport SPE 1/RM/11, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 57 p. (1990c).

Environnement Canada, “Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence”, Rapport SPE 1/RM/12, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 85 p. (1990d).

Environnement Canada, “Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*”, Rapport SPE 1/RM/21, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 73 p. (1992a).

Environnement Canada, “Méthode d'essai biologqiue : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule”, Rappport SPE 1/RM/22, Environnement Canada, Ottawa, Ont., 70 p. (1992b).

Environnement Canada, “Document d'orientation sur le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation de sédiments en vue de leur caractérisation chimique et d'essais de toxicité”, Environnement Canada, Ottawa, Ont. (1994).

EPA [United States Environmental Protection Agency], “Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure”, United States Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, Report, EPA-540/9-85-006, 12 p. Washington, D.C. (1985).

EPA, “Role of Acute Toxicity Bioassays in the Remedial Action Process at Hazardous Waste Sites”, United States Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, Report, EPA-600/8-87/044, Corvallis, OR (1987).

EPA, “Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms”, Second edition, United States Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-89/001, [prepared by C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer, and R.W. Freyberg], 248 p. Cincinnati, OH (1989a).

EPA, “Standard Operating Procedure for Microtox®—Effluent Testing Center”, United States Environmental Protection Agency, National Effluent Toxicity Assessment Center, Manuscript, revised Feb. 3, 1989, 5 p. Duluth, MN (1989b).

EPA, “Ecological Assessment of Hazardous Waste Sites: A Field and Laboratory Reference”, United States Environmental Protection Agency, Report, EPA-600/3-89/013, Corvallis, OR (1989c).

Giesy, J.P. et R.A. Hoke, “Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design”, *J. Great Lakes Res., 15:*539–569 (1989).

Kaiser, K.L.E. et J.M. Ribo, “*Photobacterium phosphoreum* Toxicity Bioassay. II. Toxicity Data Compilation”, *Toxicity Assessment, 3:*195–237 (1988).

Kaiser, K.L.E., K.R. Lum, et V.S. Palabrica, “Review of Filed Applications of the Microtox Test in Great Lakes and St. Lawrence River Waters, *Water Pollut. Res J. Canada, 23:*270–278 (1988a).

Kaiser, K.L.E., J.M. Ribo, et K. Kwasniewska, “A Microtox Test Survey of Lake St. Clair Water”, *Water Pollut. Res J. Canada, 23(3):*356–359 (1988b).

Krebs, F. “Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchbakterien”, [toxicity test with freeze-dried light-emitting bacteria.] Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 63:173–230 (1983).

McCaffery, L., “The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1) (a) of the Environmental Protection Act, 1971 and Section 32(1) of the Ontario Water Resources Act”, p. 15–22, In: *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop,* Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 862, Ottawa (Ont.), Pêches et Environnement Canada (1979).

McLeay, D.J. et J.B. Sprague, “Ten-day Test for Sediment Lethality Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods: Review of Literature for Subject-specific Information of Value in Developing Environment Canada’s Biological Test Method”, Rapport manuscrit préparé pour le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique. McLeay Associates Ltd., West Vancouver (C.-B.), 45 p. (1991).

Microbics [Microbics Corporation], 1983.
Microtox Application Notes.
Rapid toxicity screening method. N° M101.
Advantages of using several test times. N° M102.
Protection of biological waste treatment plants. N° M103.
Toxicity testing of complex effluents. N° M104.
Toxicity testing of hazardous waste. N° M105.
Toxicity testing of biomaterials and medical devices. N° M107.
Toxicity testing of groundwater. N° M108.
Comments on extrapolation and sensitivity with Microtox. N° M110. Microbics Corporation, Carlsbad, California.

Microbics, “How to Run a Standard Microtox Test” Microbics Corporation, Carlsbad, CA, Part No. 555880, Release 2, 45 p. (1988a).

Microbics, “How to Reduce Microtox Test Data” Microbics Corporation, Carlsbad, CA, Part No. 555881, Release 2, 46 p. (1988b).

Microbics, “Sucrose Based Microtox Assay Procedure” Microtox Information Sheet M-127. Microbics Corporation, Carlsbad, CA, No. 555880-R1, 2 p. (1988c).

Microbics, “ Microtox Bibliography” Microbics Corporation, Carlsbad, CA, 7 p. (1989a).

Microbics, “A Microtox Manual. How to Run Toxicity Tests Using the Microtox® Model 500”, Microbics Corporation, Carlsbad, CA, No. 555880-R1, 41 p. (1989b).

Microbics, “Samples Dissolved in Organic Solvent and Organic Solvent Extracted Samples; Assay Protocol with Samples Dissolved in Organic Solvent”, Microbics Corporation, Carlsbad, CA, Manuscrit préliminaire non numéroté.,1990, 2 p. (1990).

Microbics, “How to Run the Microtox Solid-phase Test for Soil, Sludge, and Sediment Samples”, Microbics Corporation, Carlsbad, CA, Manuscrit non numéroté, Jan. 25, 1991, 7 p. (1991a).

Microbics, “Solid-phase Test Protocols”, Microbics Corporation, Manuscrit non numéroté, Carlsbad, CA, Sept. 27, 1991, 49 p. (1991b).

Microbics, Microtox Manual. January 1992. Test Microbics Corporation, Carlsbad, CA, [nouveau guide pour effectuer les essais Microtoxavec l'analyseur de modèle 500] (1992).

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan, “Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures”. Report EPA-600/3-88/034, USEPA, Duluth, MN (1988).

Murdoch, A. et S.D. Macknight, “CRC Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling”, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 208 p. (1991).

Munkittrick, K.R. et E.A. Power, “An Evaluation of the Sensitivity of Microassays Relative to Trout and Daphnid Acute Lethality Tests”, E.V.S. Consultants, North Vancouver, B.C., rapport péparé pour Environnement Canada, Direction générale de la protection de l'environnementale de River Road, 76 p.,

Ottawa (Ont.) (1989).

Munkittrick, K.R., E.A. Power et G.A. Sergy, « The Relative Sensitivity of Microtox®, Daphnid, Rainbow Trout, and Fathead Minnow Acute Lethality Tests». *Environmental Toxicology and Water Quality, Vol. 6*, 1991, p. 35-62.

Pastorok, R.A. et D.S. Becker, "Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound", p. 431–436, In: *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean,* Sept. 18–21, 1989, Seattle, Washington, Marine Technol. Soc. and Oceanic Engnrng Soc. Inst. Electrical and Electronics Engineers, IEEE Pub. No. 89CH2780-5 (1989).

Qureshi, A.A., R.N. Coleman, et J.H. Paran, "Evaluation and Refinement of the Microtox Test for Use in Toxicity Screening", p. 89–118, In: *Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, Toxicology Series Vol. 1,* B.J. Dutka and D. Liu (eds.), Marcel Dekkar Inc., New York (1983).

Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor, et M.M. Krahn, "Use of a Bacterial Bioluminescence Assay to Assess Toxicity of Contaminated Marine Sediments", *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques, 42:*1244–1248 (1985).

Sergy. G., "Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection, C&P, DOE", Environnement Canada, July 1987, Edmonton (Alb.) (1987).

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng, et D. MacKay. "Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems–Hydrocarbon Mixture and Petroleum Products", *Environ. Toxicol. Chem., 7:*125–137 (1988).

Sloof, W., J.H. Canton, et J.L.M. Hermens, "Comparison of the Susceptibility of 22 Freshwater Species to 15 Chemical Compounds. I. (Sub)acute Toxicity Tests". *Aquatic Toxicology, 4:*113–128 (1983).

Sprague, J.B., "Factors that Modify Toxicity ", p. 124–163, In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications,* G.M. Rand et S.E. Petrocelli (éd.), Hemisphere Pub. Corp., Washington, D.C. (1985).

Strosher, M.T., "A Comparison of Biological Testing Methods in Association with Chemical Analyses to Evaluate Toxicity of Waste Drilling Fluids in Alberta", Canadian Petroleum Assoc., Calgary (Alb.) (1984).

Tay, K.-L., K.G. Doe, S.J. Wade, D.A. Vaughan, R.E. Berrigan, et M.J. Moore, "Biological Effects of Contaminants in Halifax Harbour Sediment", p. 383–426, In: *Comptes rendus du dix-septième Collque annuel sur la toxicité aquatique,* P. Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk, and W. Knapp (eds.), Nov. 5–7, 1990, Vancouver, B.C. *Canad. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1774, Vol. 1* (1991).

Thurman, H.V., *Introductory Oceanography*, Charles E. Merrill Pub. Co., Columbus, OH, 441 p. (1975).

True, C.J., et A.A. Heyward, "Relationships Between Microtox Test Results, Extraction Methods, and Physical and Chemical Compositions of Marine Sediment Samples", *Toxicity Assessment: An International Journal*, *5:*29–45 (1990).

USP, [United States Pharmacopeia, USP Subcommittee on *In-vitro* Toxicity.] Application of the concept of biological reactivity to compendial tests, *Pharmacopeial*

*Forum, 15 (1):*4804–4810 (1989).

van der Geest, S.L., “Microtox Comparison of Fresh and Frozen Sediments from the Phase IV and V Amphipod Studies”, Unpub. Rept., Environment Canada, Conservation and Protection, Pacific & Yukon Region, North Vancouver, B.C., August, 1991 (1991).

Williams, L.G., P.M. Chapman, and T.C. Ginn, “A Comparative Evaluation of Marine Sediment Toxicity Using Bacterial Luminescence, Oyster Embryo and Amphipod Sediment Bioassays”, *Marine Environ. Res., 19:*225–249 (1986).

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux regionaux d'Environnement Canada

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (au mois de novembre 1992)
Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

P. Wells
Protection de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

P. Jackman
St. John’s (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

S.J. Wade
Dartmouth (N.-É.)

D. Vaughan
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (QC)

C. Blaise
Longueuil (QC)

G. Elliot
Edmonton (Alb.)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

S.G. Yee
North Vancouver (C.-B.)

D.J. Moul
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

A.K. Kwan
Institut national de recherche sur les eaux
Ottawa (Ont.)

C. Boutin
Service canadien de la faune
Ottawa (Ont.)

J. Osborne
Bureau de la gestion des déchets
Ottawa (Ont.)

M. Bonnell
Direction de la santé des écosystèmes
Ottawa (Ont.)

D. MacGregor
Direction des affaires réglementaires et de l'intégration des programmes
Ottawa (Ont.)

R. Scroggins
Direction de dévelopment technologique
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alb.)

Gouvernement fédéral (Pêches et Océans Canada)

R. Stevens
Direction de l'océanographie et des contaminants
Ottawa (Ont.)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l’Environnement du Québec
Ste-Foy (QC)

S.G. Abertnethy
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

C.M. Neville
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

D.G. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

I..R. Smith
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ont.)

G. Westlake (président)
Ministère de l’Environnement de l’Onatrio
Rexdale (Ontario)

B. Bayer
Ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

J. Somers
Ministère de l’Environnement de l’Alberta
Vegreville (Alberta)

K. Smiley
Alberta Environmental Centre
Vegreville (Alb.)

S. Horvath
Ministère de l’Environnement et de la Colombie-britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l’Environnement et de la Colombie-britannique
North Vancouver (C.-B.)

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
105 rue McGill
8 ième étage
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Région de l'Ontario
4905 rue Dufferin
2 ième étage
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région des Prairies et du Nord
Twin Atria No. 2, pièce 210
4999-98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon*
224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

---

* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL50 existe et peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.

Exemple de format possible pour la présentation des résultats des essais Microtox (D'après Beckman, 1982)

Nº D'ÉCHANTILLON S.O. PRÉLEVÉ PAR K.W.

SOURCE $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - Réactif Baker DATE 90 10 22 HEURE 10 00

RÉSULTATS TOXIQUE ☑ NON TOXIQUE ☐ γ MAX. S.O. POUR LA CONCENTRATION S.O.

GRAPHIQUE ☑

CALCULATRICE ☐ CI ____ (____ min ____ °C) ____ ☐ % D'ÉCHANTILLON ☐ mg/L

FACTEUR DE CONFIANCE ____ ☐ AUTRE ____

LIMITES DE CONFIANCE ____ À ____

COMMENTAIRES ____

DONNÉES SUR L'ÉCHANTILLON TYPE (EFFLUENT, LIXIVIAT, ETC.) Produit chimique purifié

DATE DE L'ESSAI 90 . 10 . 22 HEURE ____

COULEUR Aucune CORRECTION REQUISE OUI ☐ NON ☑

TURBIDITÉ Aucune SÉPARATION REQUISE OUI ☐ NON ☑

pH INITIAL 5,6 pour 1% pH AJUSTÉ À S.O. AVEC S.O.

AJUSTEMENT DE LA PRESSION OSMOTIQUE MOAS ☐ NaCl ☑ AUTRE ☐ ____

PREMIÈRE DILUTION DE L'ÉCHANTILLON 1%, dilution au 1/50

ANALYSTE K.W. Nº DE LOT DU RÉACTIF M- 101289

COMMENTAIRES Pour obtenir la concentration en mg Zn^{++}/L, multiplier la CI par 65,4 ÷ 287,4

TABLEAU DES RÉSULTATS OBSERVÉS ET CALCULÉS

CUVETTE TÉMOIN	CONCENTRATION - ESSAI DÉFINITIF (PRÉCISER L'UNITÉ DE MESURE)	MESURE INITIALE I (0)	MESURES FINALES 5 min I (5)	15 min I (15)	30 min I (30)	RAPPORT DU TÉMOIN
B1	0 (TÉMOIN)	90,3	79,2	72,3	61	B1 : R (5) = 0,8771
C1	0 (TÉMOIN)	88,5	77,9	71,5	60,3	C1 : R (5) = 0,8802
SOMME DES MESURES		178,8 [A]	157,1 [B]	143,8 [B]	121,3 [B]	CORRECTION DE L'ABSORBANCE (COULEUR) I₀ = S.O.
MOYENNE DES RAPPORTS DES TÉMOINS [B] ÷ [A] = R̄ (t) =			R̄ (5) = 0,8786	R̄ (15) = 0,8043	R̄ (__) = 0,6784	I₁ = S.O. ; C = S.O.

CUVETTE D'ÉCHANTILLON	CONCENTRATION - ESSAI DÉFINITIF (PRÉCISER L'UNITÉ DE MESURE)	MESURE INITIALE I (0) [C]	MESURES FINALES 5 min I (5) [D]	15 min I (15) [D]	30 min I (30) [D]	γ - EFFETS (t, T) γ (5)	γ (15)	γ (30)	γ °C (__)
B2	3,7 mg/L	90	68,7	57,1	46,7	0,1511	0,2676	0,3074	
C2	3,7	87,1	66,8	54,9	43,4	0,1456	0,2760	0,3615	
B3	11,1	90,2	63,3	36,4	15,7	0,2520	0,9930	2,898	
C3	11,1	85,8	61,1	34,4	15,1	0,2338	1,006	2,855	
B4	33,3	85,9	46,5	13,6	4,2	0,6231	4,080	12,88	
C4	33,3	90	47	14,0	5,0	0,6825	4,170	11,21	
B5	100	81,4	24,8	4,8	1,6	1,884	12,64	33,51	
C5	100	85,1	24,9	5,0	1,8	2,003	12,69	31,07	
CI 50 (t __ min, T 15 °C)			GRAPHIQUE			50,0	11,0	6,4	
			CALCULATRICE						